



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



**KUTANÖZ LAYŞMANYAZDA
MEVCUT ANTİLAYŞMANYAL AJANLAR İLE
YENİ ADAY BİLEŞİKLER ARASINDAKİ
SİNERJİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU KÖYDEN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 1039.09



BALIKESİR

2023

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KUTANÖZ LAYŞMANYAZDA
MEVCUT ANTİLAYŞMANYAL AJANLAR İLE
YENİ ADAY BİLEŞİKLER ARASINDAKİ SİNERJİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU KÖYDEN

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MEHMET ÜNLÜ**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Bilim Alan Kodu: 1039.09**

**BALIKESİR
2023**



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde **Burcu KÖYDEN** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan
“**Kutanöz Layşmanyazda Mevcut Antilayşmanyal Ajanlar ile**
Yeni Aday Bileşikler Arasındaki Sinerjinin İncelenmesi”

başlıklı tez çalışması,

Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/06/2023

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ
Balıkesir Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yener ÖZEL
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi,
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 21/07/2023 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Ziya İLHAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi **beyan ederim**.

21/07/2023

Burcu KÖYDEN

TEŐEKKÜR

Tezimin yürütülmesinde bana rehberlik eden ve her türlü desteğini esirgemeyen danıőman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ'ye, bilimsel katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Gülhan VARDAR ÜNLÜ'ye ve Sayın Doç. Dr. Tuęba KULA ATİK'e, laboratuvar çalıőmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yener ÖZEL'e, hastane rutin mikrobiyoloji ve COVID-19 Tanı Laboratuvarı çalıőanlarına, yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman her koşulda yanımda olan, hiçbir yardımını ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Layşmanyazın Tanımı ve Tarihçesi	2
2.2. <i>Leishmania</i> spp. Taksonomisi	2
2.3. <i>Leishmania</i> spp.'nin Morfolojisi ve Evrimi	3
2.3.1. Amastigot	3
2.3.2. Promastigot.....	4
2.3.3. Yaşam Döngüsü	4
2.4. Layşmanyaz Epidemiyolojisi	5
2.5. Layşmanyaz Bulaşı.....	7
2.6. Layşmanyaz Kliniği	7
2.6.1. Kutanöz Layşmanyaz	7
2.6.2. Viseral Layşmanyaz	8
2.6.3. Mukokutanöz Layşmanyaz.....	8
2.6.4. Post Kala Azar Dermal Layşmanyaz.....	8
2.7. Layşmanyaz Tanısı.....	9
2.7.1. Mikroskopik Yöntemler	9
2.7.2. Kültür Yöntemleri	9
2.7.3. Serolojik Yöntemler	10
2.7.4. Moleküler Yöntemler	10
2.8. Layşmanyaz Tedavisi	11
2.9. Antilayşmanyaller	13
2.9.1. Meglumin Antimonat ve Sodyum Stiboglukonat.....	13
2.9.2. Miltefosin	14
2.9.3. Paromomisin.....	14

2.9.4. Amfoterisin B	15
2.10. Antibiyotikler	16
2.10.1. Tetrasiklin.....	16
2.10.2. Tigesiklin.....	16
2.10.3. Klindamisin	17
2.11. Uçucu Yağ Bileşenleri.....	18
2.11.1. Karvakrol.....	18
2.11.2. Timol	19
2.12. Antilayşmanyal Direnç	20
2.13. Doğal Aktif Bileşenlerin Antilayşmanyal Etkinlikleri.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Cihazlar	23
3.2. Antilayşmanyaller	23
3.3. Antibiyotikler	23
3.4. Uçucu Yağ Bileşenleri	23
3.5. Parazit Suşu.....	24
3.6. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	24
3.6.1. NNN Besiyerinin Hazırlanması.....	24
3.6.2. RPMI-1640 Sıvı Besiyerinin Hazırlanması.....	24
3.7. <i>Leishmania tropica</i> Suşunun Canlandırılması	24
3.8. <i>L. tropica</i> Promastigotlarının NNN Besiyerine Ekimi.....	25
3.9. <i>L. tropica</i> Suşunun RPMI-1640 Sıvı Besiyerinde Çoğaltılması	25
3.10. Antilayşmanyaller ve Antibiyotiklerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması ..	25
3.11. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	26
3.12. Antilayşmanyal Etkinliğin Belirlenmesi	26
3.12.1.MTT Çözeltilsinin Hazırlanması	27
3.12.2.MTT Yöntemi ile İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi.....	27
3.13. Sinerjik Etkileşimlerin Belirlenmesi	28
4. BULGULAR.....	31
4.1. <i>L. tropica</i> 'nın Antilayşmanyal Duyarlılık Sonuçları.....	31
4.2. <i>L. tropica</i> 'nın Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	35
4.3. <i>L. tropica</i> 'nın Uçucu Yağ Bileşenleri Duyarlılık Sonuçları.....	37
4.4. Antilayşmanyaller ile Etkin Maddelerin Sinerjik Etkileşimleri	38
5. TARTIŞMA	41

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	51
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	67

ÖZET

KUTANÖZ LAYŞMANYAZDA MEVCUT ANTILAYŞMANYAL AJANLAR İLE YENİ ADAY BİLEŞİKLER ARASINDAKİ SİNERJİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışma, *Leishmania tropica* promastigotlarına karşı mevcut antilayşmanyal ajanlar ile yeni aday bileşiklerin antilayşmanyal etkinliklerinin belirlenmesi ve konvansiyonel antilayşmanyal ajanlar ile uçucu yağ bileşenleri veya antibiyotikler arasındaki sinerjik etkileşimin incelenmesi amacıyla yapıldı.

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Parazit Bankası'ndan temin edilen *L. tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) promastigotları kullanıldı. Antilayşmanyal ajanlar, meglumin antimonat (Glucantime®), sodyum stiboglukonat (Pentostam®), paromomisin, miltefosin ve amfoterisin B, antibiyotikler (tetrasiklin, tigesiklin, klindamisin) ve uçucu yağ bileşenleri (karvakrol, timol) seçilerek çalışmaya alındı. Uçucu yağ bileşenleri, antibiyotikler ve antilayşmanyal ajanların *L. tropica* promastigotlarına karşı aktiviteleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenirken, sinerji çalışmalarında dama tahtası yöntemi kullanıldı.

Antilayşmanyal ajanlar olan pentostam, miltefosin ve amfoterisin B ile denenen tüm antibiyotiklerin, *L. tropica* promastigotlarına karşı güçlü antilayşmanyal aktiviteye sahip olduğu gösterildi. Antibiyotikler ile pentostam, miltefosin ve amfoterisin B kombinasyonlarında sinerjik etki görülürken, uçucu yağ bileşenleri ile antilayşmanyal ajanlar arasında sinerjik etki saptanmadı.

Sonuç olarak, klinik kullanımda olan antilayşmanyal ajanlarla antibiyotikler arasında sinerjik etkileşimin gösterilmesi, bu ajanların (özellikle amfoterisin B) tedavi dozunu, süresini ve yan etkilerini azaltabilmesi açısından umut vericidir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotikler, *Leishmania tropica*, sinerji, uçucu yağ bileşenleri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE SYNERGY BETWEEN EXISTING ANTILEISHMANIAL AGENTS AND NEW CANDIDATE COMPOUNDS IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS

This study was carried out to determine the antileishmanial activities of existing antileishmanial agents and new candidate compounds against *Leishmania tropica* promastigotes and to examine the synergistic interaction between conventional antileishmanial agents and essential oil components or antibiotics.

While the activities of essential oil components, antibiotics and antileishmanial agents against *L. tropica* promastigotes were determined by microdilution method with RPMI 1640, the checkerboard method was used in synergy studies.

L. tropica (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) promastigotes obtained from Parasite Bank in Dept. of Medical Parasitology of Manisa Celal Bayar University were used in this study, Antileishmanial agents, meglumine antimoniate (Glucantime®), sodium stibogluconate (Pentostam®), paromomycin, miltefosine and amphotericin B, antibiotics (tetracycline, tigecycline, clindamycin) and essential oil components (carvacrol, thymol) were selected and included in the study.

It has been shown that antileishmanial agents, sodium stibogluconate, miltefosine and amphotericin B and all antibiotics tested have strong activity, paromomycin weak activity. Combinations of all tested antibiotics with sodium stibogluconate, miltefosine and amphotericin B showed synergistic effects, while the essential oil components tested did not show a synergistic effect with any of the antileishmanial agents.

In conclusion, the demonstration of synergistic interactions between antileishmanial agents and antibiotics in clinical use has the potential to reduce the dose and duration of treatment of these agents (especially amphotericin B).

Keywords: Antibiotics, essential oil components, *Leishmania tropica*, synergy,

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AmpB	: Amfoterisin B
DKL	: Diffüz Kutanöz Layşmanyaz
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ED50	: Efektif Doz 50
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	: Fetal Calf Serum
GZ - PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IC ₅₀	: Hücrelerin %50 Canlılık Gösterdiği İnhibisyon Konsantrasyonu
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN	: İnterferon
KL	: Kutanöz Layşmanyaz
MKL	: Mukokutanöz Layşmanyaz
MPK	: Minimum Parazitisit Konsantrasyon
NNN	: Novy-Nicolle-McNeal
PKDL	: Post Kala Azar Dermal Layşmanyaz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VL	: Viseral Layşmanyaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. <i>Leishmania</i> Taksonomisi	2
Şekil 2.2. <i>Leishmania</i> Amastigot Formu	3
Şekil 2.3. <i>Leishmania</i> Promastigot Formu.....	4
Şekil 2.4. <i>Leishmania</i> 'nın yaşam döngüsü	5
Şekil 2.5. Dünya Genelinde Bildirilen Kutanöz Layşmanyaz Olguları.....	6
Şekil 2.6. Sodyum Stiboglukonatin ve Meglumün Antimonatin Kimyasal Yapısı..	13
Şekil 2.7. Miltefosinin Kimyasal Yapısı.....	14
Şekil 2.8. Paromomisinin Kimyasal Yapısı	15
Şekil 2.9. Amfoterisin B'nin Kimyasal Yapısı	15
Şekil 2.10. Tetrasiklinlerin Kimyasal Yapısı.....	16
Şekil 2.11. Tigesiklinin Kimyasal Yapısı	17
Şekil 2.12. Klindamisinin Kimyasal Yapısı.....	18
Şekil 2.13. Karvakrolün Kimyasal Yapısı	19
Şekil 2.14. Timolün Kimyasal Yapısı.....	19
Şekil 3.1. Dama Tahtası Metodunda Birinci Mikroplakanın Hazırlık Şeması	28
Şekil 3.2. Dama Tahtası Metodunda İkinci Mikroplakanın Hazırlık Şeması	28
Şekil 3.3. İnkübasyon Sonrası Dama Tahtası Mikroplakasının Görünüm Şeması..	29
Şekil 4.1. Pentostamin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri.....	32
Şekil 4.2 AmpB'nin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri	33
Şekil 4.3 Miltefosinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri.....	34
Şekil 4.4 Paromomisinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri	34
Şekil 4.5. Tetrasiklinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri	35
Şekil 4.6. Tigesiklinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri	36
Şekil 4.7. Klindamisinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri.....	36
Şekil 4.8. Karvakrolün <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri	37
Şekil 4.9. Timolün <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı IC ₅₀ Değerleri.....	38

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Etken Maddelerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	26
Tablo 4.1. Glukantime Karşı Farklı [mg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	31
Tablo 4.2. Pentostama Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	32
Tablo 4.3. AmpB'ye Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	33
Tablo 4.4. Miltefosine Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	33
Tablo 4.5. Paromomisine Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	34
Tablo 4.6. Tetrasikline Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	35
Tablo 4.7. Tigesikline Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	36
Tablo 4.8. Klindamisine Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	36
Tablo 4.9. Karvakrole Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	37
Tablo 4.10. Timole Karşı Farklı [µg/ml] da <i>L. tropica</i> Suşunun Değişen Duyarlılığı	38
Tablo 4.11. Glukantim ile Antibiyotik/UYB'lerinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı Etkileşimi	38
Tablo 4.12. Pentostam ile Antibiyotik/UYB'lerinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı Etkileşimi	39
Tablo 4.13. Miltefosin ile Antibiyotik/UYB'lerinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı Etkileşimi	39
Tablo 4.14. Paromomisin ile Antibiyotik/UYB'lerinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı Etkileşimi	39
Tablo 4.15. Amfoterisin B ile Antibiyotik/UYB'lerinin <i>L. tropica</i> Suşuna Karşı Etkileşimi.....	40
Tablo 4.16. Etken Maddelerin IC ₅₀ ve MPK Değerleri.....	40

1. GİRİŞ

Layşmanyaz, promastigot ile enfekte dişi kum sineklerinin ısırılmaları yoluyla bulaşan, *Leishmania* cinsi protozoonların neden olduğu paraziter bir hastalık olup üç ana formunun belirgin semptomları ve farklı seyirleri vardır (Griensven ve ark., 2014). Kala-azar (Zijlstra ve ark., 2003) olarak da bilinen viseral layşmanyaz (VL), hastalığın en öldürücü şekli olup tedavi edilmezse ölümlle sonuçlanmaktadır. En yaygın tip olan kutanöz layşmanyaz (KL), cilt lezyonlarına ve kalıcı yaralar bırakabilen ülserlere neden olmaktadır. Mukokutanöz layşmanyaz ise (MKL) burun, ağız ve boğazdaki dokuların kısmen veya tamamen harabiyetine yol açmaktadır (DSÖ, 2021).

Layşmanyazın tedavisinde, önemli dezavantajları bulunan çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır (Kedzierski ve ark., 2009). Bu ilaçların çoğu, yüksek maliyet, uygulama zorluğu, yüksek toksisite ve direnç gelişimi gibi sınırlamalara sahip olup klinik başarı için uzun süreli çoklu dozlar gerektirir ve bu süreç, güç tedavi yönetimine ek olarak ilaç direncinin gelişmesine de katkıda bulunabilir. Bu nedenle, layşmanyaz tedavisi için yeni, güvenli, daha etkili ve ekonomik olabilecek ilaç arayışı devam etmektedir. (Singh ve Sivakumar, 2003). Bitkisel uçucu yağ bileşenleri ve klinik kullanımda olup *Leishmania* türlerinde hedef bölgeleri bulunabilecek yeni nesil antibiyotiklerin antilayşmanyal aktiviteleri bakımından denenmesi, konvansiyonel antilayşmanyal ilaçlarla yeni aday bileşiklerin ve antibiyotiklerin kombinasyonlarının sinerjik etkileşimlerinin çalışılması ilaç arayışlarına katkıda bulunabilir.

Bu çalışmada, layşmanyaz tedavisinde ilk tercih ilaçlardan olan meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat gibi beş değerli antimon bileşiklerinin, miltefosin, paromomisin ve amfoterisin B gibi etkili alternatif antilayşmanyallerin, tetrasiklin, tigesiklin ve klindamisin gibi antiprotozoal etkili antibiyotiklerin ve karvakrol, timol gibi güçlü antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmış olan bitki uçucu yağ bileşenlerinin, *L. tropica* izolatına karşı etkinliklerinin *in vitro* sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ve konvansiyonel antilayşmanyal ilaçların uçucu yağ bileşenleri ve antibiyotiklerle sinerjik etkileşimlerinin dama tahtası yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Layşmanyazın Tanımı ve Tarihçesi

Leishmania spp.'nin ilk fosil üyesi bir kehribar fosili içinde keşfedilmiştir. Bu ilk *Leishmania* benzeri fosil, 100 milyon yıllık bir kehribarın içinde korunmuş, soyu tükenmiş kum sineği *Paleomyia burmitis*'in dışısının hortumunda ve sindirim sisteminde bulunmuştur (Poinar ve Poinar, 2004).

William Boog Leishman 1901 yılında, Hindistan'da ölen ve ateş, dalak büyümesi ve aşırı halsizlik gibi semptomları olan bir askerin dalak biyopsisinde oval yapılar görmüştür. Leishman keşfini Dum-Dum köyünde yaptığı için hastalığa "Dum-Dum ateşi" adını vermiştir (Leishman, 1903). Kısa bir süre sonra Charles Donovan da benzer oval yapıların varlığını bildirmiştir (Donovan, 1903). Veriler yayımlandıktan sonra bu yapılara Leishman-Donovan cisimcikleri adı verilmiştir.

2.2. *Leishmania* spp. Taksonomisi

Tür adı	Keşfeden	Yıl	Tür adı	Keşfeden	Yıl
<i>L. donovani</i>	Laveran ve Mesnil	1903	<i>L. gerbilli</i>	Wang, Qu ve Guan	1964
<i>L. tropica</i>	Wright	1903	<i>L. hertigi</i>	Herrer	1971
<i>L. infantum</i>	Nicolle	1908	<i>L. panamensis</i>	Lainson ve Shaw	1972
<i>L. braziliensis</i>	Vianna	1911	<i>L. amazonensis</i>	Lainson ve Shaw	1972
<i>L. peruviana</i>	Velez	1913	<i>L. aethiopica</i>	Ashford ve Bray	1973
<i>L. major</i>	Yakimoff ve Schokhor	1914	<i>L. deanei</i>	Lainson ve Shaw	1977
<i>L. archibaldi</i>	Castellani ve Chalmers	1919	<i>L. garnhami</i>	Scorza ve ark.	1979
<i>L. chagasi</i>	Cunha ve Chagas	1937	<i>L. aristidesi</i>	Lainson ve Shaw	1979
<i>L. enriettii</i>	Muniz ve Medina	1948	<i>L. killicki</i>	Rioux ve ark	1986
<i>L. mexicana</i>	Biagi	1953	<i>L. arabica</i>	Peters ve ark.	1986
<i>L. guyanensis</i>	Floch	1954	<i>L. lainsoni</i>	Silveira ve ark.	1987
<i>L. pifanoi</i>	Medina ve Romero	1959	<i>L. naiffi</i>	Lainson ve Shaw	1989

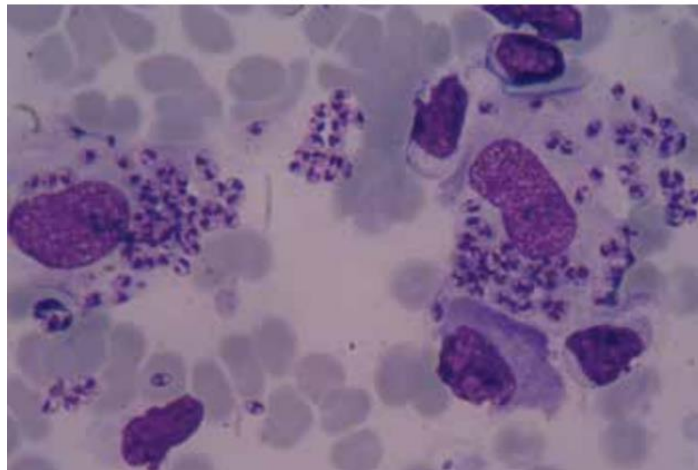
Şekil 2.1. *Leishmania* spp. taksonomisi (Steверding, 2017)

2.3. *Leishmania* spp.'nin Morfolojisi

Leishmania parazitleri, tek bir flagellum, kinetoplast, mitokondriyal benzeri organel, lizozom, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, vakuol ve DNA açısından zengin bir çekirdeğe sahip tek hücreli ökaryotik organizmalardır. Bu parazitlerin yaşam döngülerinde amastigot ve promastigot olmak üzere iki farklı morfolojik form bulunmaktadır. Parazitler, kum sineği içinde amastigottan prosiklik promastigota, daha sonra da enfektif form olan metasiklik promastigota dönüşmektedir (Omondi ve ark., 2022; Jain ve ark., 2022). Parazitin insanlarda ve rezervuarlarda bulunan kamçısız ve hareketsiz formu amastigot, vektörün gastrointestinal sisteminde bulunan kamçılı ve hareketli formu ise promastigot olarak tanımlanmaktadır (Özcel ve Daldal, 1997).

2.3.1. Amastigot

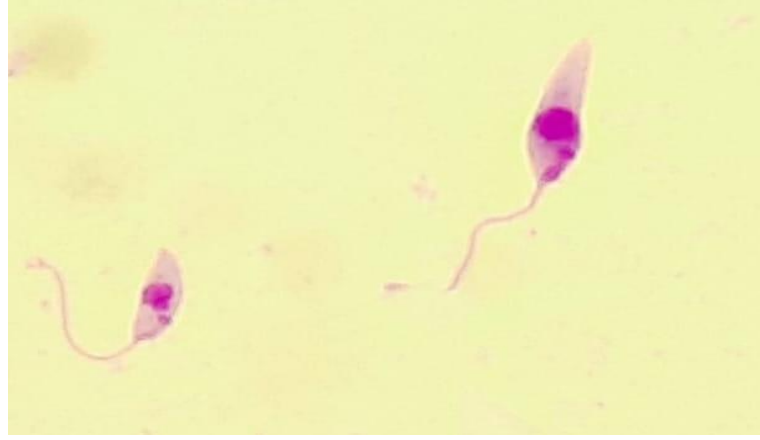
Leishmania amastigotları, 2-5 µm büyüklüğünde, yuvarlak-oval şekilli, 37°C'de bölünerek çoğalabilen hareketsiz formlardır. Parçalı çekirdekli lökositler, monositler ve endotel hücreleri içinde tek ya da gruplar halinde veya hücre dışında görülebilmektedir. Sitoplazma içerisinde arka uçta büyük bir çekirdek ve hemen bitişiğinde kinetoplast konumlanmıştır. Amastigot form, memeli konakların makrofajlarında parazitofor vakuol içinde çoğalmaktadır (Özcel ve Daldal, 1997).



Şekil 2.2. *Leishmania* amastigot formu (Harman, 2015)

2.3.2. Promastigot

Promastigot form, 15–20 µm uzunluğunda, 1.5–5 µm genişliğinde, mekik şeklinde, tek kamçılı bir yapıya sahiptir ve 26°C'de uzunlamasına bölünerek çoğalmaktadır. Kamçı ve gövdenin bağlantı noktasındaki çukurluğa “kamçı paketi” adı verilmektedir. Kinetoplastın ön kısmında ve kamçının dip kısmında bleforablast bulunmakta, ön uçta yuvarlak bir kinetoplast ve hücrenin merkezinde ise nukleus yer almaktadır (Pace, 2014; Markell ve ark., 1999; Herwaldt, 1999).

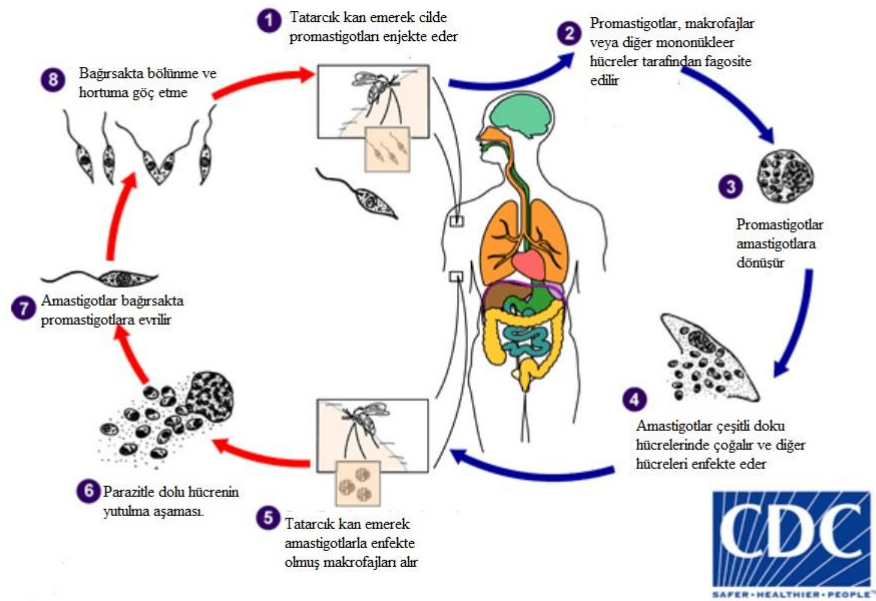


Şekil 2.3. *Leishmania* promastigot formu

2.3.3. Yaşam Döngüsü

Leishmania spp.'nin yaşam döngüsünde omurgasız vektör ve omurgalı konak olmak üzere iki farklı konak yer alır. Dişi kum sineği, layşmanyazlı omurgalı konaktan kan emerken amastigot ile enfekte olmuş makrofajları alır ve parazitin, vektörün orta bağırsağına geçmesi sonucu, azalan ortam sıcaklığı ve artan pH ile morfolojik dönüşüm başlar. Emilen kan tatarcığının orta bağırsak epitel hücreleri tarafından salgılanan peritrofik matris adı verilen bir membran ile çevrelenerek, membran içerisine sindirim enzimleri salgılanır. Bu aşamada bir kısım amastigot, proteolitik enzimler ile parçalanır, parçalanmayanlar ise uzayarak ön ucunda kısa bir kamçısı bulunan ve hareketleri zayıf olan prosiklik ve sadece omurgalı konak için enfektif olan promastigotlara dönüşür (Poinar, 2008). Bu formlar orta bağırsağı doldurur ve peritrofik zar parçalandıkça kamçılarıyla vektörün karnına tutunur. Promastigotların kum sineğinin karnına tutunmasına lipofosfoglikanın aracılık ettiği düşünülmektedir

(Sacks, 1992). Prosiklik promastigotlar, vektörün vücudunda çoğalabilirler ve 48 – 72 saat içerisinde, daha uzun ve ince ayrıca iyi hareket edebilen, nektomonad formlara başkalaşır. Nektomonad formlar, peritrofik matriksi çözerek gastrik lümen girer ve flagellaları ile bağırsak epitelinin mikrovilluslarına yapışarak haptomonad promastigotlara dönüşür. Mikrovilluslara yerleşen bu formlar, başka bir proliferasyon aşamasına geçen promastigot salgı jeli üreten leptomonadlara evrilir. Leptomonadlar ise çoğalarak midenin ön kısmındaki yemek borusu ve yutak kıvrımlarına yapışarak lümeni tıkar ve tatarcığın ağız kısımlarına göç ederek, omurgalı konak için bulaşıcı olan metasiklik promastigotlara dönüşür (Omondi ve ark., 2022; Bates, 2008).

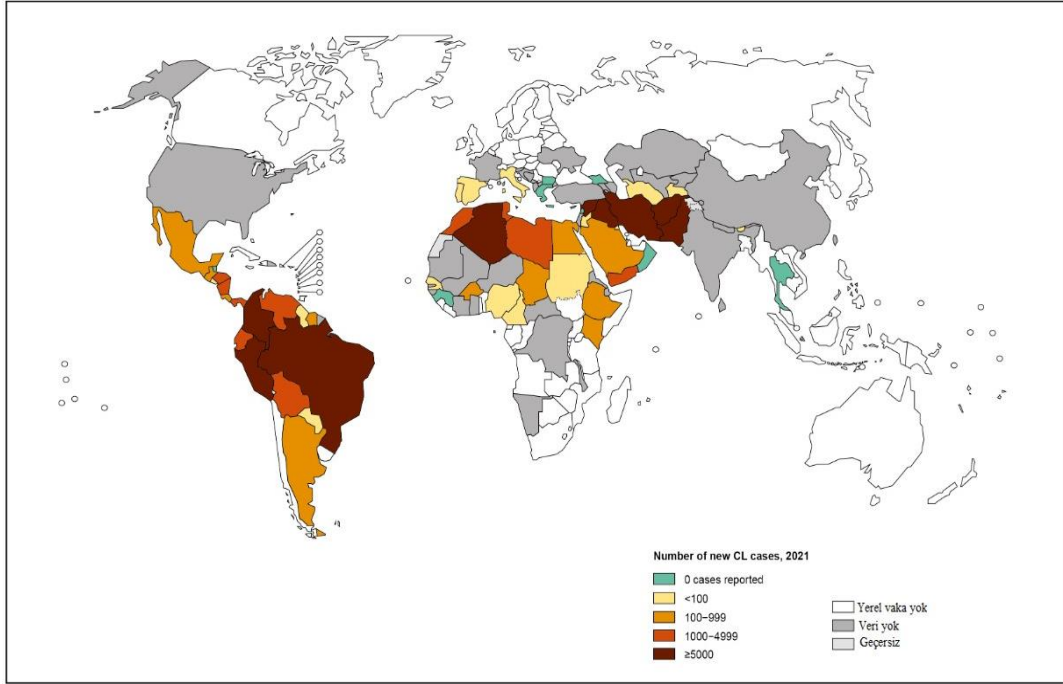


Şekil 2.4. *Leishmania* yaşam döngüsü

2.4. Layşmanyaz Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü 2021 yılı verilerine göre, Kutanöz Layşmanyaz'ın (KL) 92 ülke veya bölgede, Viseral Layşmanyaz'ın (VL) ise 83 ülke veya bölgede endemik olarak görüldüğü bildirilmiştir. Endemik bölgelerde 1 milyardan fazla insan enfeksiyon riski altında yaşamaktadır. Her yıl tahmini olarak 30.000 yeni VL olgusu ve 1 milyondan fazla yeni KL olgusu rapor edilmektedir. Kutanöz layşmanyaz olgularının %90'ından fazlası Afganistan, Brezilya, İran, Irak, Suriye, Cezayir,

Kolombiya, Fas, Peru, Sudan, Tunus ve Yemen’de, VL olgularının ise %90’ından fazlası Brezilya, Hindistan, Sudan, Etiyopya, Kenya ve Somali’de görülmektedir (DSÖ, 2022).



Şekil 2.5. Dünya genelinde bildirilen kutanöz layşmanyaz olguları (DSÖ, 2021)

Layşmanyaz, 1988–2010 yılları arasında bildirilen toplam 50.381 KL olgusu ile Türkiye’de önemli bir halk sağlığı sorununa dönüşmüş durumdadır. Kutanöz layşmanyaz öncelikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde endemik olarak görülmekte olup başlıca etkeni *L. tropica*’dır. Ancak son yıllarda ülkenin orta ve batı bölgelerinde *L. major* ve *L. donovani* kaynaklı yerli olguların sayısında belirgin bir artış görülmektedir. Bu durum, söz konusu bölgelerde KL epidemiyolojisinin değiştiğine işaret etmektedir (Özbilgin ve ark., 2020).

Suriye’de yaşanan iç savaş ve sığınmacı krizi nedeniyle sığınmacı kamplarında veya çatışma bölgelerinde yaşayan yüz binlerce insan KL salgınından olumsuz etkilenmektedir. İç savaşın çıkmasından önce, Suriye’de KL’nin yıllık insidansı yaklaşık 23.000 olgu iken 2012’de ve 2013’ün ilk yarısında sırasıyla 53.000 ve 41.000 KL olgusu bildirilmiştir (Saroufım ve ark., 2014).

2.5. Layşmanyaz Bulaşı

Eski Dünya kutanöz layşmanyazında vektör *Phelobotomus*, Yeni Dünya kutanöz layşmanyazında ise *Lutzomyia* cinsine ait kum sinekleri vektör görevi görür (Maroli ve ark., 2013). Yaklaşık 800 türü tanımlanmış kum sineklerinin 93 türü layşmanyaz bulaşından sorumludur. Erişkinleri 2-3 mm boyutlarında olan kum sineklerinin kanatları karınlarına açılı olarak konumlanmış bir şekilde karakteristiktir. Beslenme aktiviteleri yoğun olarak geceleri ve ılık ortamlarda gerçekleşir, bu sebeple sıcak iklimlerde yaşayan insanların uyurken vücudun açıkta kalan kısımlarından ısırılma olasılığı yüksektir (Pace, 2014).

Layşmanyaz, insandan insana bulaşın görüldüğü özellikle Sudan, Afganistan ve Hindistan'daki kentsel çevreler dışında geniş bir rezervuar yelpazesine sahip zoonotik bir hastalık olup (Alptekin D., 1999) insanlar, köpekler ve kemirgenler bu parazit için ana rezervuardır (Burza ve ark., 2018).

2.6. Layşmanyaz Kliniği

2.6.1. Kutanöz Layşmanyaz (KL)

Kutanöz layşmanyaz, halk arasında Şark çıbanı, Halep çıbanı, güzellik çıbanı, yıl çıbanı gibi isimlerle bilinen, dünyada en sık karşılaşılan ve dermal lezyonlarla kendini gösteren, mortalite oranı son derece düşük ve kutanöz enfeksiyonlara bağlı morbiditenin önemli olduğu bir klinik seyir izler (Burza ve ark., 2018). KL lezyonu, enfekte dişi kum sineği tarafından ısırılan yüz, boyun ve ekstremiteler gibi çıplak bölgelerde eritematöz bir papül olarak başlar. Yavaş büyür ve haftalar veya aylar sonra, ortasında yapışkan bir kabukla kaplı ülser bulunan nodül veya plak haline dönüşür. Ülsere sıkıca tutunan sert kabuk kaldırıldığında kabuğun alt tarafında "Hulusi-Behçet çivi belirtisi" olarak bilinen çivi benzeri çıkıntılar görülür (Harman, 2015). Parazit türüne bağlı olarak değişiklik gösteren inkübasyon dönemi yaklaşık 1-8 ay sürmektedir. KL lezyonlarında yaygın olan sekonder bakteriyel enfeksiyonlar nedeniyle lezyonda ağrılar meydana gelebilir ve lezyon boyutları 0.5-3 cm arasında değişebilir. Bazı durumlarda lenfatik yayılım sonucu lezyonlar ülserleşmemekte ve

parazit, uydu benzeri dağılım gösteren lezyonlarla karakterize bir mantar enfeksiyonu olan sporotrikoz hastalığına benzer bir klinik tablo oluşturmaktadır (Hepburn, 2000).

2.6.2. Viseral Layşmanyaz (VL)

Hintçe'de kara ateş anlamına gelen ve Kala-Azar adıyla bilinen VL'de parazitik iç organ tutulumu gözlenir. Bu enfeksiyon şekli genellikle *L. donovani* ve *L. infantum* türleri tarafından meydana gelir (Burza ve ark., 2018). Nadir olarak da *L. mexicana* ve *L. tropica* türleri tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir (Barral ve ark., 1986; Sacks ve ark., 1995; Özbilgin ve ark., 2017). Parazitin inkübasyon dönemi 2 hafta ile 8 ay arasında değişebilmekte ve klinik tablo, immün yanıtı güçlü bireylerde aylarca asemptomatik olarak seyredebilmektedir (Ready, 2014). Akut veya subakut başlangıçlı klinik semptomlar gösterebilen VL, özellikle hastaneye geç başvuran hastalarda pansitopeni ile birlikte hepato-splenomegaliye neden olan, tedavi edilmediğinde ise sekonder enfeksiyonlar ve şiddetli anemi nedeniyle ölüme yol açabilen ateşli kronik bir hastalıktır (Burza ve ark., 2018; Zijlstra ve ark., 2003).

2.6.3. Mukokutanöz Layşmanyaz (MKL)

Mukokutanöz layşmanyaz, oronazofaringeal mukoza ve kıkırdakta hasar oluşması nedeniyle skar bırakan ve bazen larinksli etkileyerek aspirasyon pnömonisine yol açabilen, potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir klinik durumdur (Burza ve ark., 2018). Genellikle Yeni Dünya'da görülen bu klinik formun başlıca etken türü *L. braziliensis* olmakla birlikte *L. panamensis*, *L. guyanensis* ve *L. amazonensis* türlerinin de mukokutanöz layşmanyaza neden olabildiği bildirilmiştir (Goto ve Lindoso, 2010).

2.6.4. Post Kala Azar Dermal Layşmanyaz (PKDL)

Post Kala Azar Dermal Layşmanyaz (PKDL), VL tedavisi almış sağlıklı bireylerde uzun süre sonra ortaya çıkan maküler, makulopapüler ve nodüler lezyonlarla birlikte görülmektedir. VL sırasında, IFN- γ üretmeyen periferik kan

mononükleer hücreleri, VL tedavisinden sonra inokülasyon bölgesinde canlı kalan parazitlere karşı bir reaksiyon olarak IFN- γ üretmekte ve yüz, gövde ve uzuvlarda PKDL lezyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Burza ve ark., 2018; Zijlstra ve ark. 2003).

2.7. Layşmanyaz Tanısı

2.7.1. Mikroskopik Yöntemler

Duyarlılığına ilişkin endişeler olmasına rağmen, doğrudan parazitolojik tanı yüksek özgüllüğü nedeniyle layşmanyaz tanısında hala altın standart olarak kabul edilmektedir (Goto ve Lindoso, 2010). Doğrudan tanı yöntemleri, kullanılan metodolojiye ve laboratuvar yapısına bağlı olarak zaman alıcı olabilmektedir (saatler ile haftalar arasında) (De Brito ve ark., 2020). Doğrudan parazitolojik tanı, formalin gömülü dokunun histopatolojik analizi veya şüpheli lezyonlardan alınan örneklerden *in vitro* kültür ile yapılabilmektedir. Amastigot formlar, doğrudan biyopsi örneklerinden yapılan yaymalarda Giemsa boyama yöntemiyle ışık mikroskobu yardımıyla saptanabilmektedir. Amastigotlar, tipik çekirdeklere ve kinetoplastlara sahip, 2–4 μ m çapında yuvarlak veya oval yapılar olarak tanımlanmaktadır. İmmünohistokimyasal boyama yardımıyla amastigotlar daha kolay saptanabilir (Goto ve Lindoso, 2010). En yüksek verim genellikle ülser tabanından yapılan yaymalardan alınmaktadır. Amastigotları ve mikrogranülomu saptamak için uygulanan ince iğne aspirasyonu hasta konforu açısından lezyon kazıntı yaymalarından daha üstündür (Hosseinzadeh ve ark, 2012).

2.7.2. Kültür Yöntemleri

Şüpheli lezyonlardan alınan örneklerin Novy–MacNeal–Nicolle besiyeri içeren tüplerde kültürü nispeten zordur ve teknik uzmanlık gerektirmektedir. Ayrıca yöntem kontaminasyona açık ve zaman alıcıdır (Boggild ve ark., 2008). Kültür yönteminin duyarlılığı düşük ve oldukça değişkendir (Faber ve ark., 2003). Mini kültür ve mikro kültür teknolojileri, daha az kültür ortamı gerektirdiğinden daha az maliyetli

olup parazit verimi düşük örneklerde bile daha kolay uygulama ve daha yüksek hassasiyet sağlamaktadır (Boggild ve ark., 2008). Kültür yöntemleri parazit izolasyonu açısından avantajlıdır ancak tür tayini yapılamamaktadır.

2.7.3. Serolojik Yöntemler

İndirekt floresan antikor (IFA), enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), western blot (WB) ve immunokromatografik testler, KL'nin serolojik tanısında kullanılan başlıca yöntemlerdir. Bununla birlikte, enfeksiyonun neden olduğu hümmoral bağışık yanıtın ve test duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle, güncel tanı kılavuzları KL tanısında serolojik yöntem kullanımını önermemesine (Goto ve Lindoso, 2010; Kar K., 1995; Aronson, 2017) karşın, KL tanısında kullanılabilir serolojik yöntemleri iyileştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. *Leishmania* suşlarının amastigotlarından elde edilen saf antijenlerin kullanımının daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Bracamonte, 2020). Özellikle özgüllüğü yüksek rekombinant antijenlerin kullanıldığı testlerle, çözünür antijen bazlı ELİSA testlerine kıyasla daha iyi sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir (Zanetti, 2019). Komplike olması ve altyapı gerektirmesi göz önüne alındığında, ELISA ve IFA için en uygun alternatifin, hızlı tanı testleri olabileceği düşünülmektedir. VL için, Doğu Afrika hariç (Griensen ve Diro, 2019) nispeten iyi tanı performansına sahip, *L. donovani*'nin rK39 amino asit sekans tekrarına (varyantlarına) dayalı birkaç hızlı tanı testi geliştirilmiştir (Griensen ve Diro, 2019). Buna karşılık, KL için sınırlı sayıda test geliştirilmiş olup KL Detect™ Hızlı Tanı Testi (amastigot peroksidoksine karşı poliklonal antikorlar kullanan membran bazlı kalitatif bir immünolojik test), deri örneklerinde KL'ye neden olan tüm *Leishmania* türlerinin saptanması için kullanılmaktadır.

2.7.4. Moleküler Yöntemler

Moleküler yaklaşımlar ve özellikle PZR yöntemi, geleneksel tanı yöntemlerine kıyasla hem duyarlılık hem de özgüllük açısından üstün özelliklere sahip olduğu için KL tanısında devrim yaratmıştır (Moreira ve ark., 2018). Yakın geçmişte moleküler tanı için ribozomal DNA (Odiwuor ve ark., 2011; Monroy-Ostria ve ark., 2014) veya

kinetoplast DNA'sı (kDNA) içindeki sekanslar PZR hedef bölgeleri olarak kullanılmıştır (Satow ve ark., 2013; Jara ve ark., 2013). Farklı PZR testlerinin birebir karşılaştırmaları yeterli düzeyde çalışılmadığından ve her laboratuvar moleküler testlerde kendi kurum içi yöntemini uyguladığından, genel kabul görmüş protokoller henüz hazırlanmamıştır (Moreira ve ark., 2018). Bununla birlikte, yakın tarihli bir sistematik inceleme ve meta-analiz, PZR'nin KL için en doğru tanısal yaklaşım olduğunu göstermektedir (Mesa ve ark., 2020). Ayrıca, KL hastalarında tedavi sürecinin takibi için kantitatif PZR'nin (qPCR) önerilmesi ve tedavi başarısızlıklarının tespit edilmesi için kullanılabilir olması dikkate değerdir (Mans ve ark., 2016). PZR yönteminin en önemli dezavantajı, gelişmiş laboratuvar altyapısına ve uzman teknisyenlere olan gereksinimidir. PZR yöntemlerinin basitleştirilmesi için yakın zamanda izotermal tanı platformları geliştirilmiştir. PZR platformları sıkı bir şekilde kontrol edilen ve değişen sıcaklık döngüleri gerektirirken, izotermal testler sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilebilmektedir. Döngü aracılı izotermal reaksiyon (LAMP), 60 °C ve 65 °C'de gerçekleştirilen, amplifikasyon için yalnızca tek bir enzim (Bst DNA polimeraz) kullanan ve 30–60 dk içinde büyük miktarlarda DNA üretebilen moleküler bir yöntemdir. LAMP yöntemi, altı primer kullanılıp son ürün çıplak gözle okuma (bulanıklık) ve yanal akış şeritleri gibi basit algılama yöntemleri kullanılarak doğrudan görselleştirilebildiği için, yüksek özgüllüğe sahip olup KL teşhisinde yaygın olarak benimsenmektedir (Adams ve ark., 2010; Erber, 2022).

2.8. Layşmanyaz Tedavisi

Kutanöz layşmanyaz lezyonlarının çoğu 2-18 ay içinde kendi kendine iyileşmektedir (Burza ve ark., 2018). KL'de kullanılan tedavi, nüksü, mukozal tutulumu, lokal yayılımı önleyerek iyileşmeyi hızlandırmakta ve skar riskini azaltmaktadır. Parazitolojik olarak doğrulanmış tüm KL olguları tedaviye alınmakla birlikte, baş ve boyun yerleşimi dışında kalan tek ve lezyon boyutu 1 cm'nin altında olan olgular lezyonların gelişimi bakımından periyodik takibe alınmaktadır (Aytekin, 2009).

Layşmanyaza yönelik kullanımda olan ilaçlar oldukça toksik ve pahalı olup, bugüne kadar FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından kabul edilmiş olan

etkili bir aşı da henüz geliştirilememiştir. Bunun yanında hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan beş değerli antimon bileşiklerine karşı direnç gelişimi de rapor edilmiştir (Croft, 2006).

Tedavide birincil seçenekler arasında beş değerli antimon bileşikleri yer almaktadır. Neredeyse tüm layşmanyaz olgularında beş değerli antimon bileşikleri ilk tercihtir. Lezyonların tedavisinde meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat gibi terapötik olarak eşdeğer iki farklı antimon bileşiği ile uzun süreli enjeksiyon tedavisi uygulanmaktadır (Memişoğlu, 1997; DSÖ, 2010).

Sodyum stiboglukonat veya meglumin antimonat bileşikleri intramüsküler (İM), intravenöz (İV) ya da intralezyonel (İL) olarak uygulanabilmektedir. Fakat hastalığın tekrarlanma oranının %25'in üstünde olması, yan etki profilinin fazla olması ve tedavinin uzun sürmesi bu ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır (Schwartz, 2006). Sistemik ilaç kullanımına bağlı toksik yan etkilerin sınırlandırılması için, İL tedavisinin tercih edilmesi önerilmektedir (Memişoğlu, 1997). Beş değerli antimonların layşmanyazdaki kesin etki mekanizması iyi anlaşılmamıştır, ancak makrofaj parazit öldürücü aktiviteyi etkilemekte ve parazitin moleküler süreçleri üzerinde doğrudan etki eden faktörlere sahip olduğu tahmin edilmektedir (McGwire ve ark., 2014). *Leishmania*'ya karşı daha düşük yan etkili ve daha güçlü bir ilaç henüz geliştirilemediğinden DSÖ tarafınca meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat halen ilk tercih edilen ilaçlar olarak önerilmektedir (McGwire ve ark., 2014).

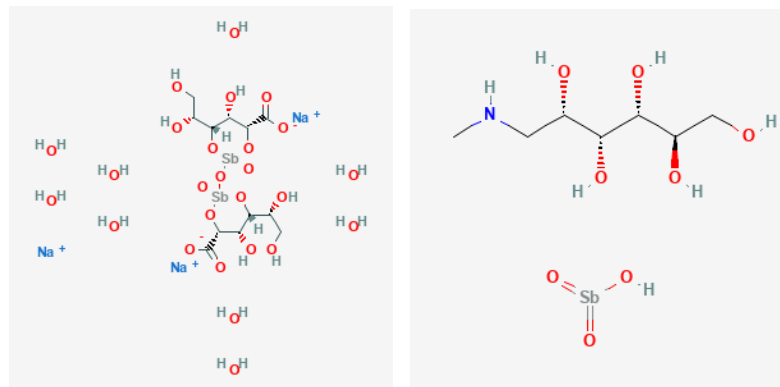
İkinci seçenek olarak önerilen dapson, nifurtimoks, allopurinol, rifampisin ve klorokin gibi ilaçlarda tedaviye yanıt beklenen etkide değildir ve bu ilaçların kullanımı ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır (Mitropoulos, 2010). Sistemik kemoterapi tedavisinde önerilen ikinci seçenek ilaçlardan olan amfoterisin B, ketakonazol, allopurinol, rifampin ve pentamidin gibi ilaçlar potansiyel toksik etkileri ve sınırlı klinik kullanım nedeni ile yalnızca yanıt alınamayan olgularda kullanılmaktadır (Memişoğlu, 1997). KL'de yeni kullanıma giren monoklonal antikolar, immün modülatörler ve fotodinamik terapi yaklaşımları umut verici görünmektedir (Mitropoulos, 2010). Seçilmiş olgularda, ilaç tedavisi haricinde kriyoterapi, lazer, koter ve cerrahi eksizyon gibi seçenekler invaziv yöntemlere alternatif oluşturmaktadır (Memişoğlu, 1997).

KL genellikle yüzeysel skar bırakarak iyileştiğinden, hastaya en uygun tedavi düzenlemesi tercih edilmelidir. İki veya daha fazla sayıda, çok büyük lezyonların varlığında ve skar gelişiminin istenmediği lokalizasyonlarda (yüz gibi) ve mukoza tutulumunda sistemik tedaviler tercih edilirken, tek ve küçük çaplı lezyonlarda en uygun tedaviler topikal, fiziksel ve intralezyonel tedavilerdir. Tedavi hedeflerinden birisi de skar oluşumunu engellemek olduğundan, fiziksel tedavi yöntemleri seçilirken oluşabilecek skar veya hiper-hipopigmentasyonlar göz önünde bulundurulmalıdır (Aytekin, 2009).

2.9. Antilayşmanyaller

2.9.1. Meglumin Antimonat ve Sodyum Stiboglukonat

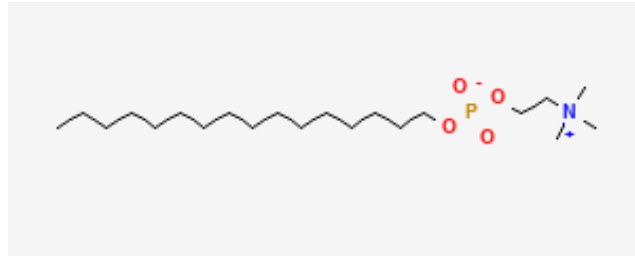
Beş değerli antimoniyaller, sodyum stiboglukonat (pentostam) veya meglumin antimonat (glukantim), kutanöz ve mukokutanöz layşmanyaz tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar olmakla birlikte, bu ilaçlarla tedavi pahalı ve kardiyak toksisite ve hepatik enzim düzeylerinde yükselme gibi ciddi yan etkilere neden olmasının yanı sıra etkisiz olup düşük tedavi yanıtına sebep olur. Ayrıca bazı türler bazı ilaçlara karşı daha dirençli olduğundan, tedavinin etkinliği enfeksiyona dahil olan *Leishmania* türlerine de bağlıdır (Berbert ve ark., 2018). Beş değerli antimoniyaller parazitleri direk ve indirek mekanizmalarla öldürürken, konak immün sisteminin ilacın aktivitesini etkilemesinin mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (Ouellette ve ark, 2013).



Şekil 2.6. Sodyum stiboglukonatın ve Meglumin antimonatın kimyasal yapısı (Pubchem)

2.9.2. Miltefosin

Alkalifosfokolinler serisinden (hexadecylphosphocholine) olan Miltefosin, 1980'lerde kanser önleyici bir madde olarak geliştirilen geniş spektrumlu antimikrobiyal, antilayşmanyal, fosfolipid yapıda bir ilaçtır. Miltefosin, ilk olarak *L. donovani*'ye karşı *in vitro* ortamda etkili bir ilaç olarak keşfedilmiş ve daha sonra Hindistan'da yapılan çalışmalarla viseral layşmanyaz tedavisi için önerilmiştir (Croft ve ark., 1987; Sundar ve ark., 2001; McGwire ve ark., 2014). Miltefosinin etki mekanizması tam olarak bilinmese de alkali-lipid metabolizması ve fosfolipid biyosentezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Lux ve ark., 2000). Promastigotlarda *in vitro* yapılan çalışmalarda apoptotik hücre ölümünü indüklediği gözlenmiş (Paris ve ark., 2004) ancak *Leishmania*'nın apoptoz mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Debrabant ve ark., 2003; Zangger ve ark., 2002). *Leishmania* gibi apoptoz benzeri ölüm şekli gösterebilecek parazitlerde kullanılan ilaçların, moleküler olarak etki mekanizmasının bilinmesi ve ilaç direncinin *in vitro* olarak gözlenmesi, parazitlerdeki apoptoz mekanizmasının aydınlatılmasına da yardımcı olabileceği düşünülmektedir. (Perez-Victoria ve ark., 2003; Seifert ve ark., 2003).

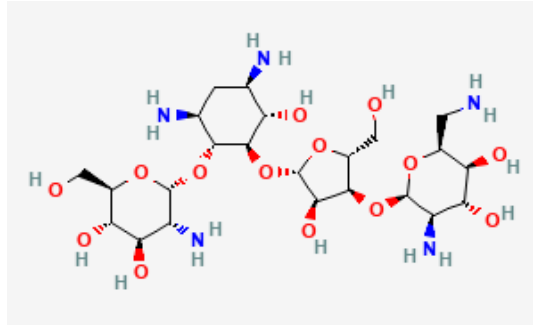


Şekil 2.7. Miltefosinin kimyasal yapısı (Pubchem)

2.9.3. Paromomisin

Paromomisin Gram-negatif ve birçok Gram-pozitif bakteri ile bazı protozoa ve sestodlara karşı etkili bir aminoglikoziddir. Bir antibiyotik olarak kullanılsa da 2007 yılında Hindistan'da VL için etkili, iyi tolere edilen ve uygun fiyatlı bir tedavi olarak gösterilmiştir (Davidson ve ark., 2009) Paromomisinin, topikal ve parenteral formları hem VL hem de KL tedavisi için kullanılmıştır (Jhingran, 2009).

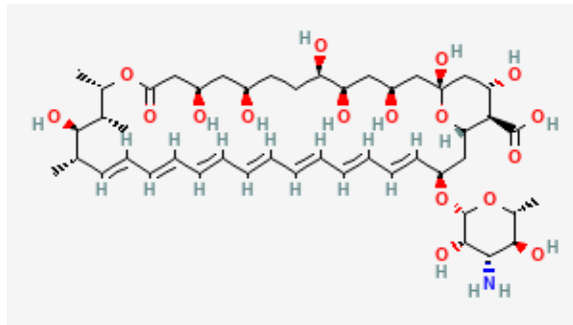
Paromomisin, iyi etkinliği, düşük maliyeti, daha kısa uygulama süresi ve güvenilir olması ile birinci basamak ilaç olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Sundar, 2008).



Şekil 2.8. Paromomisinin kimyasal yapısı (Pubchem)

2.9.4. Amfoterisin B

Amfoterisin B (AmpB) *Streptomyces nodosus* tarafından üretilen, geniş spektrumlu bir antifungal aktiviteye sahip polihidroksil ve hidrofobik polien moleküldür (Tiphine, 1999; Kleinberg, 2006). Amfoterisin B, maya ve küflerin yanı sıra protozoan bir parazit olan *Leishmania*'ya karşı etkili, geniş bir aktivite yelpazesine sahip bir antifungal ajandır. AmpB, mantar hücre zarının temel bileşenlerinden biri olan ergosterol'e bağlanarak zarın depolarize olmasına ve hücre zarı geçirgenliğinin değişmesine neden olur. Bu, önemli hücre içi bileşenlerinin hücre dışına sızmasına, hücre zarının yırtılmasına ve böylece hücre ölümüne yol açar. Ayrıca mantar hücrelerinde oksidatif hasarı indükleyebilen bu ajanın konak bağışıklık hücrelerini uyardığı bildirilmiştir (Tiphine, 1999; Bern, 2006). Mantarlar gibi, *Leishmania*'nın da major membran sterolu, ergostane merkezli yapılandırılmış olup, bu durum AmpB'nin *Leishmania*'ya olan etkisini en iyi şekilde açıklamaktadır (Goad ve ark., 1984).

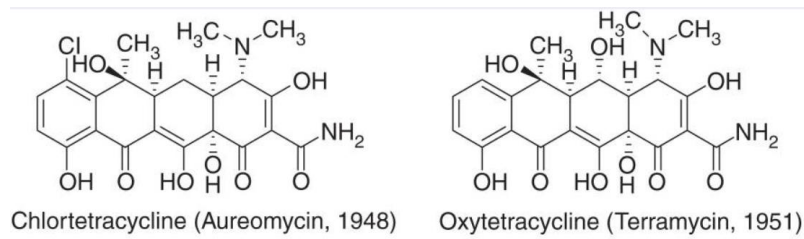


Şekil 2.9. Amfoterisin B'nin kimyasal yapısı (Pubchem)

2.10. Antibiyotikler

2.10.1. Tetrasiklin

Tetrasiklin antibiyotikler, çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, spiroketler, zorunlu hücre içi bakteriler ve ayrıca protozoan parazitleri kapsayan geniş spektruma sahiptirler. İlk tetrasiklinler, *Actinomycetes*'lerden doğal olarak elde edilmekteydi. *Streptomyces aureofaciens* tarafından üretilen ve Aureomycin olarak pazarlanan klortetrasiklin ilk olarak 1948'de Benjamin Duggar tarafından geliştirilmiş ve aynı yıl klinik kullanım için onaylanmıştır (Duggar, 1948). Kısa süre sonra, 1950'de ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ve Terramycin adıyla pazarlanan oksitetrasiklin izole edilmiştir (Finlay ve ark., 1950). Tetrasiklinlerin birçoğu, komplike olmayan solunum, ürogenital, gastrointestinal ve diğer nadir ve ciddi enfeksiyonların tedavisi için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tetrasikline karşı direnç mekanizmaların yayılması, kullanımlarını daraltmış ve kullanımı yalnızca doğrulanmış duyarlılığı olan enfeksiyon etkenleri ile sınırlı kalmıştır. 1980'lerin sonlarında, tetrasikline özgü direnç mekanizmalarına sahip ve tedavisi zor olan çoklu ilaç dirençli (MDR) Gram-negatif ve Gram pozitif patojenlerin ortaya çıkması, tetrasiklinlerin optimizasyonuna olan ilginin yeniden canlanmasını sağlamıştır.

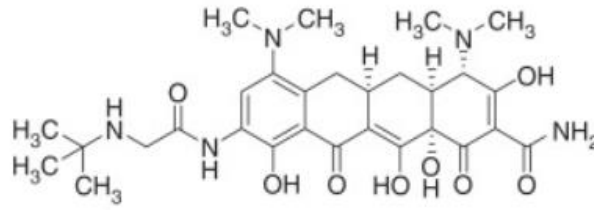


Şekil 2.10. Tetrasiklinlerin kimyasal yapısı (Grossman, 2016)

2.10.2. Tigesiklin

Yarı sentetik bir glisilsiklin olan tigesiklin, 1993 yılında keşfedilmiş ve 2005'te klinik kullanıma sunulmuştur (Sum ve Petersen, 1999; Zhanel ve ark. 2004). Tigesiklin, diğer antibiyotik sınıflarına dirençli patojenlerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlar için önemli bir tedavi seçeneği olmaya devam etmektedir. Parenteral kullanılabilen tigesiklin, MRSA, vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. (VRE),

çoklu ilaç dirençli *A. baumannii*, GSBL üreten ve karbapenem dirençli Enterobacteriaceae (CRE), cilt enfeksiyonları, karın içi enfeksiyonları ve toplumdan edinilmiş bakteriyel pnömoninin tedavisinde kullanılmaktadır (Stein ve Babinchak, 2013; Wyeth Pharmaceuticals 2016). Tigesiklin uygulaması sadece IV ile sınırlıdır. Çoklu ilaç dirençli patojenlere karşı aktivitesi göz önüne alındığında, tigesiklinin hastanede edinilmiş pnömoni, ventilatörle ilişkili pnömoni ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında kullanımı tercih edilmektedir (Wyeth Pharmaceuticals, 2016).



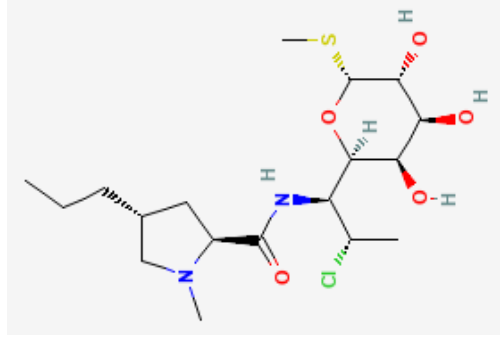
Şekil 2.11. Tigesiklinin kimyasal yapısı (Grossman, 2016)

2.10.3. Klindamisin

Klindamisin, bakteriyostatik etkisini, bakteriyel ribozomun 50S alt birimine bağlanarak mikrobiyal proteinlerin sentezini inhibe ederek göstermektedir. Ribozomal birimleri hedefleyerek doğrudan antibakteriyel etkiye ek olarak, klindamisin klinik etkinliğini artıran bir dizi benzersiz farmakolojik özelliği vardır. Klindamisin, virülans faktörlerinin ekspresyonunu inhibe ederek bakterilerin mukozal yüzeydeki epitel hücrelerine yapışmasını azaltan tek antibiyotiktir. Bu antibiyotik, A grubu β -hemolitik streptokokların M protein üretimini inhibe eder, böylece fakültatif Gram-pozitif streptokok türlerinde kapsül oluşumunu bloke eder. Ayrıca *S. aureus* ve *Clostridium* türleri tarafından üretilen proteinleri, enzimleri, sitokinleri ve toksinleri de inhibe eder (Brook ve ark., 2005; Spížek ve Řezanka, 2017)

Klindamisin, çoğu anaerobik bakteri ve MRSA lar dahil Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu solunum, kemik ve yumuşak doku, boyun, yüz, karın ve pelvik enfeksiyonları ile bazı protozoon türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Klindamisin ile ilişkili en yaygın yan etki ishaldir. Psödomembranöz kolite neden olabilen *Clostridium difficile* kolitine bağlı, antibiyotikle ilişkili ishal sıklıkla klindamisin kullanıma bağlı olarak gelişmektedir.

Bu artan riskler nedeniyle, klindamisin kullanımı genellikle ciddi enfeksiyonları olan veya beta-laktam aşırı duyarlılığı olan hastalarla sınırlıdır. Diğer bazı olumsuz etkiler arasında ağızda metalik tat, karaciğer transaminazlarında geçici yükselmeler, granülositopeni ve trombositopeni sayılabilir (Sánchez-Borges ve ark., 2013; PubChem, 2020).

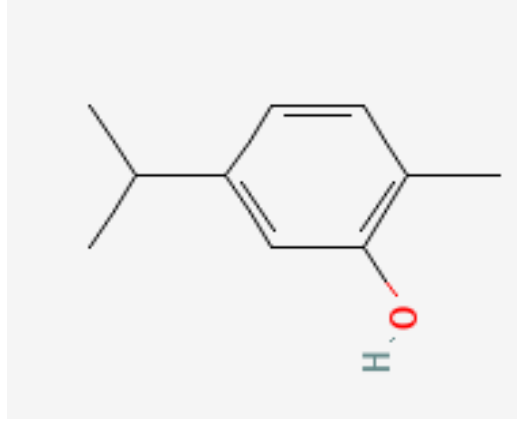


Şekil 2.12. Klindamisinin kimyasal yapısı (Grossman, 2016)

2.11. Uçucu Yağ Bileşenleri

2.11.1. Karvakrol

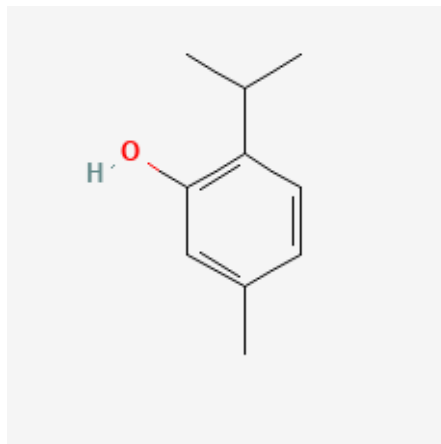
Karvakrol, (2-metil-5-(1-metiletil) fenol) biberiye (*Lepidium flavum*), keklikotu (*Origanum vulgare*) uçucu yağında, kekik (*Thymus vulgaris*), vahşi bergamot (*Citrus aurantium* var. bergamia Loisel) ve diğer bazı bitkilerde bulunan likit fenolik monoterpenoiddir (Fachini-Queiroz ve ark., 2012; Tang ve ark., 2011). Bu biyoaktif molekülün, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan ve antikarsinojenik gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Du ve ark., 2008; Sánchez, Aznar ve Sánchez, 2015; Guimarães ve ark., 2010; Arunasree, 2010). Özellikle antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle, gıda endüstrisinde doğal bir gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır (Daferera ve ark., 2003).



Şekil 2.13. Karvakrolün kimyasal yapısı (Pubchem)

2.11.2. Timol

Timol (5-metil-2-izopropilfenol), *Thymus* ve *Origanum* bitkilerinden elde edilen uçucu yağların ortak bir bileşenidir ve bu yağlara antimikrobiyal özellikler kazandırır (Mahmoud. 1994; Sivropoulou, 1996). Timol, tıbbi antiseptikler, yara iyileştirici maddeler, gıda koruyucuları ve tatlandırıcılar gibi çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (Amiri, 2012; Avrupa İlaç Ajansı, 2013). Timol, Gıda ve İlaç İdaresi'ne (FDA) göre genel olarak güvenli kabul edilen bir gıda katkı maddesidir (Zhang ve ark., 2014). Ayrıca yüzey dezenfektanı, antimikrobiyal ve antioksidan katkı maddesi olarak kullanılmasının yanında parfümeri gibi farklı alanlarda da kullanılmaktadır (Fachini-Queiroz ve ark., 2012; Komaki ve ark., 2016).



Şekil 2.14. Timolün kimyasal yapısı (Pubchem)

2.12. Antilayşmanyal Direnç

Beş değerli antimon bileşikleri layşmanyaza karşı 1920'lerden beri kullanılan başlıca ilaçlar olup, bu toksik bileşiklerin dar bir terapötik aralığı vardır. Bu ilaçlara karşı direnç gelişimi oldukça yaygınlaşmasına karşın Latin Amerika ve Doğu Afrika da dahil olmak üzere dünyanın diğer bölgelerinde hala kullanılmaktadır (Mitropoulos ve ark., 2010; DSÖ, 2017). Miltefosin, kala-azar eliminasyon programı bağlamında Hindistan'da antimon bileşiklerinin yerini almıştır, ancak bu ilacın etkinliğinde piyasaya sunulmasından sonraki on yıl içinde düşme gözlenmiştir (Sundar ve ark., 2012; Rijal ve ark., 2013). Son zamanlarda, ilk olarak Fransa'da HIV ile ko-enfekte bir hastada ve daha sonra iki Hintli hastada olmak üzere, birkaç dirençli klinik izolat tanımlanmıştır (Mondelaers ve ark., 2016; Srivastava ve ark., 2017; Cojean ve ark., 2012). Amfoterisin B, serbest deoksikolat formunda enjekte edildiğinde oldukça etkilidir ancak nispeten toksiktir. Lipozomal formülasyonun yüksek maliyeti, kullanım aralığını kısıtlamış olmasına rağmen, toksisite riskini azaltmıştır. Ancak, bu ilaç için de bir direnç riski ortaya çıkmaya başlamıştır. Fransa'da HIV-*Leishmania* koenfeksiyonlarında tedavi başarısızlığı, İsviçre'de bağışıklığı baskılanmış bir hastada ise AmpB yanıtı sızlığı bildirilmiştir (Morizot ve ark., 2016; Eichenberger ve ark., 2017). Paromomisin, *Leishmania* türlerine karşı sınırlı bir aralığa sahiptir. Laboratuvar ortamında dirençli izolatlar geliştirilmiş olmasına rağmen sahadaki dirençle ilgili durum belirsizliğini korumaktadır (Hendrickx ve ark., 2016; Bhandari ve ark., 2014).

Tedavi başarısızlığının (TB) ve ilaç direncinin (İD) eşanlamlı olmadığını dikkate almak önemlidir. TB, konak (bağışıklık veya beslenme durumu gibi), parazit (örneğin, parazitin ilaçlara erişemediği dokularda bulunması) ve çevre (örneğin, küresel ısınmaya katkıda bulunan) ile ilgili birçok faktöre bağlıdır. Bununla birlikte, İD, tedavi sonucunun temel belirleyicisidir ve parazitlerin ilaca direnç mekanizmalarının anlaşılması esastır (Ponte-Sucre ve ark., 2017).

2.13. Doğal Aktif Bileşenlerin Antilayşmanyal Aktivitesi

Mevcut ilaçlarla sürdürülen tedavi, toksik yan etkiler, yüksek maliyet, nüks sıklığı, direnç gelişimi ve uzun süreli tedavi gerekliliği gibi çeşitli sınırlamalara

sahiptir (Haldar ve ark., 2011; Murugan ve ark., 2018). Bu nedenle, bu parazitik hastalığa karşı yeni ilaç geliştirme yatırımları riskli bir alan olarak görülmektedir. Tıbbi bitkiler, geleneksel ilaçların en önemli kaynaklardır. DSÖ, dünya nüfusunun yaklaşık %80'inin birinci basamak sağlık hizmetleri için doğal bitkisel ilaçlara güvendiğini ifade etmiştir (Et-Touys ve ark., 2017). Ayrıca, tüm dünyada kullanılan ilaçların %25 ile 50'si bitkisel ve doğal ürünlerden elde edilmektedir (Santos ve ark., 2008). Bu nedenle, layşmanyaz tedavisine yönelik mevcut araştırma yaklaşımları, tıbbi bitkileri önemli bir araştırma alanı olarak büyük ölçüde ele almaktadır. Doğal bitkilerin antilayşmanyal etkinliğine yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların %84.2'si *in vitro*, %15.8'i ise *in vivo* ortamda gerçekleştirilmiştir. 80 şifalı bitki, farklı *Leishmania* türlerine (*L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* ve *L. mexicana*) ve yaşam döngüsü formları karşı (amastigotlar ve/veya promastigotlar) *in vitro* olarak taranmıştır. 103 bitki özütünün/esansiyel yağın *in vitro* olarak belirlenen IC₅₀ değeri, 0.88 µg/mL (*Boswellia serrata*'nın diklorometan ekstraktının polar fraksiyonu) ile 98 µg/mL (*Mrayya koenigi*'nin petrol eteri ekstraktı) aralığında bulunmuştur (Hassan ve ark., 2022).

Bazı şifalı bitkiler, hücre zarından kolayca geçiş yapabilen ve sonuç olarak hücre içi hedeflere erişim sağlayan farklı hidrofobik moleküllerden oluşan uçucu yağlardan zengindir (Colares ve ark., 2013; Machado ve ark., 2014). Ayrıca lipit molekülleri ile çevrili sitoplazmik zarlarda bulunan ATPazlar ve diğer proteinler üzerinde de etki edebilirler. Ayrıca proteinlerin hidrofobik kısımlarında lipit-protein etkileşimlerinin bozulmasına neden olabilirler veya yapısal bölümlerin sentezinde yer alan enzimlerle etkileşime girebilirler. Terpenler, hücre zarının çift katmanlı lipid tabakasına kolayca nüfuz edebilir ve *Leishmania* parazitlerinin hücre yapısı ve mitokondriyal zarının bütünlüğünde değişikliklere yol açabilir (Colares ve ark., 2013). Örneğin, Artemisinin apoptozu, mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonunu ve DNA fragmantasyonunu indüklemiştir (Sen ve ark., 2007; Sen ve ark., 2010). Ursolik asit, kaspaz 3/7'den bağımsız, ancak mitokondriye bağımlı olarak programlanmış hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu bileşik, KL'nin lezyon boyutunu ve parazit yükünü *in vivo* olarak azaltmıştır (Machado ve ark., 2014). (-)- α -Bisabolol, sitoplazmik membran hasarına neden olmasına ek olarak, ATP seviyelerini düşürerek mitokondriyal membran potansiyelini bozmaktadır (Hajaji ve ark.; 2018).

Flavonoidler gibi antioksidan bileşiklerden zengin bitkiler, morfolojik değişiklikleri başlatarak ve hücresel bütünlüğün kaybına neden olarak G1 fazında hücre döngüsünün durmasına yol açabilmektedir (Sen ve Chatterjee, 2011). Ayrıca parazit mitokondrilerine zarar verebilmektedir (Colares ve ark., 2013). Kumarin grubu içindeki çeşitli yapılar, antilayşmanyal aktivite dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Hassan ve ark., 2022).

Yukarıda etkinlikleri sıralanan aday fitokimyasalların seçici antiparaziter özellik göstermeleri, düşük toksisiteye sahip olmaları/kimyasal olarak modifiye edilmeleri ve farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi, artan antilayşmanyal dirence karşı yürütülen ilaç çalışmalarına katkı verecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında bulunan ve bu çalışmada kullanılan cihazlar aşağıda belirtilmiştir;

Otoklav (Hiyarama HG-50); Etüv (Memmert IN160); Pastör fırını (Binder ED53); Hassas terazi (Sartorius TE214S); Isıtcılı manyetik karıştırıcı (IKA RT5); Biyogüvenlik kabini (Labonco); İnvvert mikroskop (Olympus CKX41SF); Spektrofotometre (Thermo Scientific Varioskan Flash; Tıbbi Biyokimya AD)

3.2. Antilayşmanyaller

Çalışmada kullanılan antilayşmanyal etken maddelerden beş değerli antimon bileşikleri olarak sodyum stiboglukonat (pentostam) ve meglumin antimonat (glukantim) için hasta preparatları kullanıldı. Miltefosin (B2693-072166), paromomisin (1263-89-4) ve amfoterisin B (1397-89-3)'nin saf ve analitik formları ise BOCSscience (USA) firmasından sağlandı.

3.3. Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotik etken maddeleri, klindamisin, Bilim İlaç firmasından, tetrasiklin (T7660) ve tigesiklin (PZ0021) ise Sigma-Aldrich firmasından sağlandı.

3.4. Uçucu Yağ Bileşenleri

Çalışmada kullanılan uçucu yağ bileşenlerinden karvakrol (232197) ve timol (T0501) ün saf ve analitik formları Sigma-Aldrich firmasından sağlandı.

3.5. Parazit Suşu

Çalışmada kullanılan referans *L. tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) suşu, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan Parazit Bankası'ndan sağlandı.

3.6. Besiyerlerinin Hazırlanması

3.6.1. Novy-Nicole-McNeal (NNN) Besiyerinin Hazırlanması

1. 1.4 g Agar ve 0.6 g NaCl, 90 mL distile suda çözdürüldü ve otoklavda (121°C'de 15 dk) steril edildi.
2. Besiyeri 50-55°C'ye kadar soğutulduktan sonra 10 mL defibrine tavşan kanı ve 0.2 mL penisilin/streptomisin solüsyonu eklendi.
3. Steril vidalı kapaklı tüplere, hazırlanan besiyerinden 4'er mL dökülerek 10° eğimde besiyerinin katılması sağlandı.
4. Besiyerleri kullanılacağı zamana kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.6.2. RPMI-1640 Stok Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen RPMI-1640 besiyeri içerisine %10 FCS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 gentamisin eklenerek stok sıvı besiyeri hazırlandı. Besiyeri kullanılacağı zamana kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.7. *Leishmania tropica* Suşunun Canlandırılması

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Parazit Bankası'nda sıvı azot içinde saklanan *L. tropica* promastigotları, sıcaklığı

37°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda kısa süre tutuldu ve promastigotların canlılığı ışık mikroskobunda 40x büyütmede kontrol edildi.

3.8. *Leishmania* Promastigotlarının NNN Besiyerine Ekimi

NNN besiyerleri oda sıcaklığına getirildi. NNN besiyerine 1 mL RPMI-1640 stok sıvı besiyeri eklendi ve sıvı azottan çıkarılarak su banyosunda bir süre tutulan *L. tropica* promastigotları steril cam pastör pipeti yardımı ile NNN besiyerine inoküle edildi. Promastigot eklenmiş NNN besiyerleri 26°C'lik etüvde beş gün bekletildi. Dört günlük inkübasyondan sonra besiyerinin sıvı kısmından cam pastör pipeti kullanılarak örnek alındı ve direk preparat hazırlanarak promastigot üremesi ve yoğunluğu ışık mikroskobunda 40x'lik objektif kullanılarak kontrol edildi.

3.9. *Leishmania* Suşunun RPMI-1640 Sıvı Besiyerinde Çoğaltılması

NNN besiyerinde yeterli üreme yoğunluğuna ulaşmış ve logaritmik faza girmiş olan promastigotlar ilaç duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere NNN besiyerinden stok RPMI-1640 sıvı besiyerine pasajlandı ve 26°C'de inkübasyona bırakıldı. Promastigot inoküle edilmiş RPMI-1640 sıvı besiyeri bulunan flasklara 2-3 günde bir taze besiyeri eklenerek, yeterli miktarda promastigot elde edildi. İlaç duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere yoğunluğu 10^6 promastigot/mL olacak şekilde parazit süspansiyonu hazırlandı.

3.10. Antibiyotiklerin ve Antilayşmanyal ilaçların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Antibiyotik ve antilayşmanyal etken maddeler ile birlikte gönderilen protokollerden uygun çözücü/sulandırıcı çeşidi ve potens değeri belirlendi. Antibiyotik ve antilayşmanyal ilaç konsantrasyonları EUCAST kriterleri doğrultusunda hesaplandı. Hassas terazide tartılan antibiyotik ve antilayşmanyal etken maddelerin uygun çözücülerle, Tablo 3.1.'de belirtilen konsantrasyonlarda stok

çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler 1 ml'lik miktarlarda test edilecekleri zamana kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.1. Etken maddelerin stok çözeltilerinin hazırlanması

Etken Maddeler	Çözücü	Sulandırıcı	Çalışma Konsantrasyonu
Meglumin antimonat*	-	-	300.000 µg/mL
Sodyum stiboglukonat*	-	-	100.000 µg/mL
Paromomisin	Su	Su	16.400 µg/mL
Miltefosin	Su	Su	1.000 µg/mL
Amfoterisin B	Su	Su	10 µg/mL
Tetrasiklin	Su	Su	16.400 µg/mL
Tigesiklin	Su	Su	16.400 µg/mL
Klindamisin	Su	Su	5.120 µg/mL
Karvakrol	DMSO	RPMI-1640	1024 mg/mL
Timol	DMSO	RPMI-1640	4096 mg/mL

*Hasta preparatlarından direk çalışılmıştır.

3.11. Uçucu Yağ Bileşenlerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen uçucu yağ bileşenlerinden karvakrol ve timolün stok çözeltileri, RPMI-1640 sıvı besiyeri kullanılarak sırasıyla, 256 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı.

3.12. *In vitro* Mikrodilüsyon Yöntemi

Antilayşmanyal ilaçlar, antibiyotikler ve uçucu yağ bileşenlerinin antilayşmanyal aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile *in vitro* olarak belirlendi. İlaç duyarlılık testlerinde; steril, düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültür plağındaki 12 sıranın 1'i pozitif kontrol, 1'i negatif kontrol, geri kalan kuyucuklar da 2'li sıralar halinde etken maddeler için kullanıldı. Her bir kuyucuğa stok RPMI-1640 sıvı besiyerinden (%10 FCS + %1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) 100 µL dağıtıldı. Mikroplakanın etken maddeler için ayrılmış bölümlerinin ilk kuyucuklarına, etken madde süspansiyonundan 100 µL pipetlenerek seri dilüsyon yapıldı. Seri dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra 10⁷ promastigot/mL yoğunluğundaki parazit

süspansiyonundan negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara 100 µL eklendi. Mikroplakanın kapağı kapatılarak etrafı parafilm ile kaplandı ve 26°C’de inkübasyona alındı. İnkübasyonun 24, 48 ve 72. saatlerinde etken maddelerin IC₅₀ değerleri MTT yöntemi ile belirlendi.

3.12.1 MTT Solüsyonunun Hazırlanması

Hassas terazide 50 mg 3-(4,5- dimetil tiazol -2-il)-2,5-di fenil tetrazolyum bromür (MTT) tartılıp 10 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlanan 5 mg/mL konsantrasyondaki MTT çözeltisi 1 mL’lik tüplere bölündü ve 0.22 µm’lik membran filtreden geçirilerek steril edilip kullanılacağı zamana kadar -20°C’de muhafaza edildi. Çalışma öncesinde -20°C’de muhafaza edilen 1 mL MTT solüsyonu 37°C’lik sıcak su banyosunda çözdürülerek 10 mL RPMI-1640 ile sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.12.2 MTT Yöntemi ile İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi

İnkübasyon süresi biten mikroplakaların her bir kuyucuğundan 100 µL alınarak yeni bir 96’lık steril mikroplakaya aynı düzende aktarıldı. Önceden hazırlanmış MTT solüsyonundan yeni mikroplakanın tüm kuyucuklarına 100 µL eklendi. Mikroplakalar parafilm ile sarıldı ve 26°C’de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Dört saatin ardından etüvden çıkarılan plakların her kuyucuğuna formazan kristallerinin çözünmesi için 100 µL DMSO eklendi ve 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikroplakalar spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi. Absorbans değerlerinin hesaplanması sonucunda belirlenen % canlılık değerlerine göre etken maddelerin MPK (minimum parazitisit konsantrasyon) değerleri parazit canlılığının olmadığı en küçük konsantrasyon olarak saptandı.

3.13. Sinerjik Etkileşimlerin Belirlenmesi

Antilayşmanyaller ile antibiyotikler veya uçucu yağ bileşenleri arasındaki etkileşim dama tahtası (*checkerboard*) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla her kombinasyon için 2 adet 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplaka kullanıldı. Birinci mikroplakanın her bir kuyucuğuna RPMI-1640 besiyerinden 50 µL dağıtıldı. IC₅₀ değerinin 3 sulandırım üstünden başlayıp 5 sulandırım altına kadar, antilayşmanyal ilaçların dikey düzlemde seri dilüsyonları yapıldı (Şekil 3.1).

BİRİNCİ MİKROPLAKA (ANTILAYŞMANYAL MİKROPLAKASI)											
ANTILAYŞMANYAL SERİ SULANDIRIM ALANI								KONTROL ALANI		MİK ALANI	
								AL	AB/UYB		
128	128	128	128	128	128	128	128	ÜREME KONTROL (RPMI-1640 + LEİSHMANİA)	BESİYERİ KONTROL (RPMI-1640)	128	2560
64	64	64	64	64	64	64	64			64	1280
32	32	32	32	32	32	32	32			32	640
16	16	16	16	16	16	16	16			16	320
8	8	8	8	8	8	8	8			8	160
4	4	4	4	4	4	4	4			4	80
2	2	2	2	2	2	2	2			2	40
1	1	1	1	1	1	1	1			1	20

Şekil 3.1. Dama tahtası metodunda birinci mikroplakanın hazırlık şeması

İKİNCİ MİKROPLAKA (AB/UYB MİKROPLAKASI)									
AB/UYB SERİ SULANDIRIM ALANI								BOŞ ALAN	
20	40	80	160	320	640	1280	2560		
20	40	80	160	320	640	1280	2560		
20	40	80	160	320	640	1280	2560		
20	40	80	160	320	640	1280	2560		
20	40	80	160	320	640	1280	2560		
20	40	80	160	320	640	1280	2560		
20	40	80	160	320	640	1280	2560		
20	40	80	160	320	640	1280	2560		

Şekil 3.2. Dama tahtası metodunda ikinci mikroplakanın hazırlık şeması

İkinci mikroplakanın 8. sütununa kadar tüm kuyucuklarına 70 µL RPMI-1640 besiyeri dağıtıldı. 8. sütundaki kuyucuklara 70 µL antibiyotik solüsyonu eklenerek, yatay düzlemde sağdan sola doğru seri dilüsyon yapıldı (Şekil 3.2).

İkinci mikropalakada yapılan dilüsyonlar, birinci mikropalakaya birebir aynı kuyucuğa olmak üzere 50 µL aktarılarak, Şekil 3.3.'da görüldüğü gibi her kuyucukta her iki etken maddenin farklı kombinasyonları elde edildi (Pillai vd., 2005).

Logaritmik faza girip yeterli yoğunlukta üremiş *L. tropica* promastigotlarından hazırlanan 10⁷/mL yoğunlukta parazit süspansiyonundan 100 µL, birinci mikropalakanın besiyeri ve sterilite kontrol kuyucukları hariç tüm kuyucuklarına eklendi. Üreme kontrolü (RPMI 1640+promastigot), besiyeri kontrolü (RPMI 1640) ve sterilite kontrolü (RPMI 1640+antilayşmanyal/antibiyotik, RPMI 1640+antilayşmanyal/uçucu yağ bileşeni) için 4'er kuyucuk kullanıldı. Mikropalakalar 26°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her sütun ve satırda üreme olmayan en düşük konsantrasyondaki kuyucukların FİKİ değerleri baz alındı. Tüm çalışmalar iki kez tekrar edildi.

1

ANTILAYŞMANYAL	2	2 10	2 20	2 40	2 80	2 160	2 320	2 640	2 1280	b	c	4	2560
	1	1 10	1 20	1 40	1 80	1 160	1 320	1 640	1 1280	b	c	2	1280
	0.5	0.5 10	0.5 20	0.5 40	0.5 80	0.5 160	0.5 320	0.5 640	0.5 1280	b	c	1	^a 640
	0.25	0.25 10	0.25 20	0.25 40	0.25 80	0.25 160	0.25 320	0.25 640	0.25 1280	b	c	^a 0.5	320
	0.125	0.125 10	0.125 20	0.125 40	0.125 80	0.125 160	0.125 320	0.125 640	0.125 1280	b	c	0.25	160
	0.062	0.062 10	0.062 20	0.062 40	0.062 80	0.062 160	0.062 320	0.062 640	0.062 1280	b	c	0.125	80
	0.031	0.031 10	0.031 20	0.031 40	0.031 80	0.031 160	0.031 320	0.031 640	0.031 1280	b	c	0.062	40
	0.015	0.015 10	0.015 20	0.015 40	0.015 80	0.015 160	0.015 320	0.015 640	0.015 1280	b	c	0.031	20
		2.5	5	10	20	40	80	160	320				
ANTİBİYOTİK/UÇUCU YAĞ BİLEŞENİ													

Şekil 3.3. İnkübasyon sonrası dama tahtası mikropalakasının görünüm şeması

Promastigot üreyen kuyucuklar pembe, üremeyen kuyucuklar beyaz ve FİKİ hesaplanacak kuyucuklar mavi renk ile temsil edilmektedir, ^aAntilayşmanyal ile antibiyotiğin/uçucu yağ bileşeninin MİK değeri, ^bÜreme kontrolü (RPMI-1640+Promastigot), AB: Antibiyotik, AL: Antilayşmanyal, UYB: Uçucu Yağ Bileşeni.

Antilayşmanyaller ile antibiyotikler/uçucu yağ bileşenleri arasındaki etkileşim, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ) hesaplanarak belirlendi. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı.

FİKİ= FİK Antilayşmanyal + FİK Antibiyotik/Uçucu Yağ Bileşeni

$$FİKİ= \frac{\text{Kombinasyondaki AL MİK} + \text{Kombinasyondaki AB/UYB MİK}}{\text{AL MİK} + \text{AB/UYB MİK}}$$

Hesaplanan FİKİ değerleri, sınır değerlere göre yorumlandı.

Etkileşimler, ≤ 0.5 : sinerji; $>0.50-0.75$: kısmi sinerji; $>0.75-1$: aditif;
 $>1.00-4.00$: etkisiz (indifferent) ve ≥ 4.00 : antagonizma olarak değerlendirilmeye alındı (Li ve ark., 2013).

4. BULGULAR

Antilayşmanyal etken maddelerden meglumin antimonat (glukantim) ve sodyum stiboglukonat (pentostam)'ın ticari preparatları, miltefosin, paromomisin, AmpB; antibiyotiklerden tetrasiklin, tigesiklin ve klindamisin; uçucu yağ bileşenlerinden karvakrol ve timolün antilayşmanyal etkinlikleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ve bu maddeler arasındaki sinerjik etkileşimler ise dama tahtası yöntemiyle çalışılmıştır. Denenen tüm maddelerin IC₅₀ değerleri ise Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, www.graphpad.com) programı ve [log(inhibitor) vs. normalized response – Variable slope] denklemi ile belirlenmiştir.

4.1. *Leishmania tropica*'nın Antilayşmanyal Duyarlılık Sonuçları

Beş değerli antimon bileşiklerinden meglumin antimonatın ticari preparatı olan glukantim *L. tropica* suşuna karşı *in vitro* etkinliğinin zayıf olduğu görüldü. Bu çalışmada denenen ticari preparatın konsantrasyonu 300 mg/mL olup, 75-0.58 mg/mL dilüsyon aralığında çalışıldı ve dilüsyonların tamamında promastigotların canlı olduğu tespit edildi. *L. tropica* suşuna karşı glukantim için IC₅₀ değeri > 75000 µg/ml olarak belirlendi (Tablo 4.1). Glukantim için en yüksek ilaç konsantrasyonunda dahi %100 hücre canlılığı olduğu için IC₅₀ değeri tam olarak hesaplanamadı.

Tablo 4.1. Glukantime karşı farklı [mg/mL] da *L. tropica* suşunun duyarlılığı

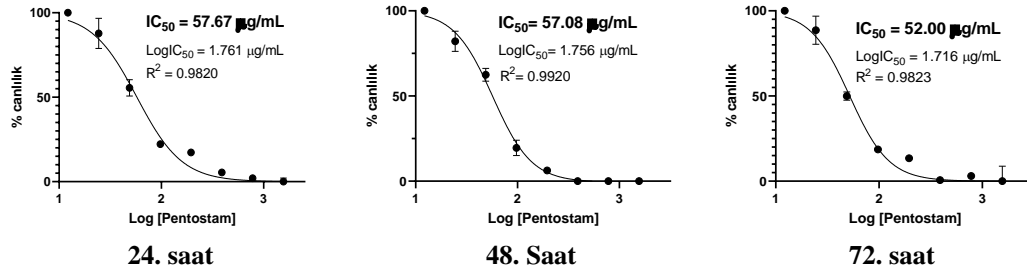
Zaman	Glukantim konsantrasyonu (mg/mL)							
	75	37.5	18.75	9.375	4.68	2.34	1.17	0.58
Canlılık (%) - 24. saat	100	100	100	100	100	100	100	100
Canlılık (%) - 48. saat	100	100	100	100	100	100	100	100
Canlılık (%) - 72. saat	100	100	100	100	100	100	100	100

Beş değerli antimon bileşiklerinden sodyum stiboglukonatın ticari preparatı olan pentostamın *L. tropica* suşuna karşı *in vitro* olarak etkili olduğu görüldü. Ticari

preparatın konsantrasyonu 100 µg/mL idi. Çalışma solüsyonu, mikroplakadaki son dilüsyon aralığı 1562-12 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 781 µg/mL konsantrasyona kadar promastigot canlılığı görülmezken 12 µg/mL konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Sodyum stiboglukonatin antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 57.67 µg/ml, 57.08 µg/ml ve 52 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.2, Şekil 4.1).

Tablo 4.2. Pentostama karşı farklı [µg/mL] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

Zaman	Pentostam konsantrasyonu (µg/mL)							
	1562	781	390	195	97	48	24	12
Canlılık (%) - 24. saat	0	3.9	6.6	18.8	22.6	52.8	94.2	100
Canlılık (%) - 48. saat	0	0	6.1	6.8	22.7	59.8	86.3	100
Canlılık (%) - 72. saat	0	0	0	18.2	24.7	54.5	83.8	100

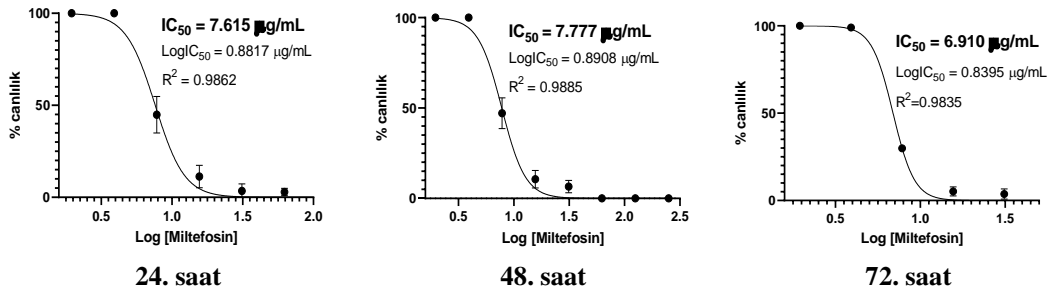


Şekil 4.1. Pentostamın *L. tropica* suşuna karşı IC₅₀ değerleri

Antilayşmanyal ilaçlardan miltefosinin *L. tropica* suşuna karşı *in vitro* olarak etkili olduğu görüldü. Çalışma solüsyonu, mikroplakadaki son dilüsyon aralığı 256-2 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 64 µg/mL konsantrasyona kadar promastigot canlılığı görülmezken 4 µg/mL konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Miltefosinin antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 7.615 µg/mL, 7.777 µg/mL ve 6.910 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.3, Şekil 4.2).

Tablo 4.3. Miltefosine karşı farklı [$\mu\text{g}/\text{mL}$] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

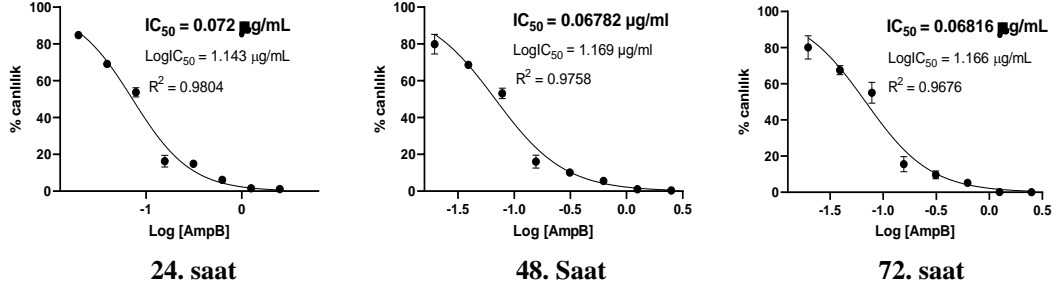
Zaman	Miltifosin konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
	256	128	64	32	16	8	4	2
Canlılık (%) - 24. saat	5.7	4.9	7.5	9.3	10.1	53.5	100	100
Canlılık (%) - 48. saat	0	0	0	9	14.1	53.2	100	100
Canlılık (%) - 72. saat	0	0	0	9.5	19.2	39.6	100	100

**Şekil 4.2.** Miltefosinin *L. tropica* suşuna karşı IC_{50} değerleri

AmpB'nin *L. tropica* suşuna karşı *in vitro* olarak etkili olduğu görüldü. Çalışma solüsyonu, mikropalakadaki son dilüsyon aralığı 2.5-0.019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyona kadar promastigot canlılığı görülmezken 0.019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda promastigotların %100'e yakın kısmının canlı olduğu saptandı. AmpB'nin antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC_{50} değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 0.072 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.067 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 0.068 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak hesaplandı (Tablo 4.4, Şekil 4.3).

Tablo 4.4. AmpB'ye karşı farklı [$\mu\text{g}/\text{mL}$] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

Zaman	AmpB konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019
Canlılık (%) - 24. saat	1	1.2	5.8	15.8	18.5	55.5	69	84.4
Canlılık (%) - 48. saat	0.3	0.8	6.5	9.0	13.5	51.1	69.2	76.1
Canlılık (%) - 72. saat	0	0	6	8.1	12.6	50.9	69.3	75.6

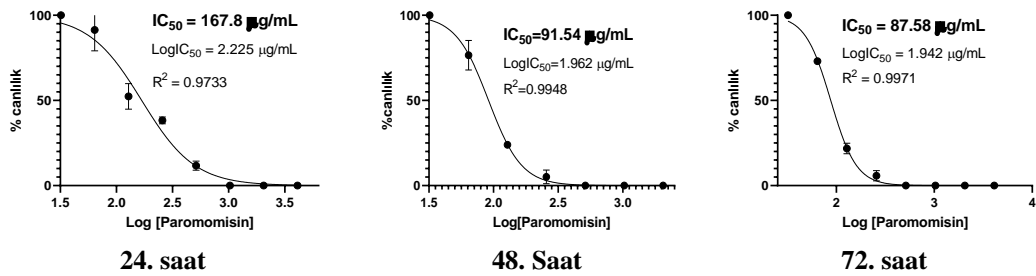


Şekil 4.3. AmpB'nin *L. tropica* suşuna karşı IC₅₀ değerleri

Paromomisin'in *L. tropica* suşuna karşı *in vitro* olarak etkili olduğu görüldü. Çalışma solüsyonu, mikroplakadaki son dilüsyon aralığı 4096-32 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 512 µg/mL konsantrasyona kadar promastigot canlılığı görülmezken 64 µg/mL konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Paromomisin'in antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 167.8 µg/mL, 91.54 µg/mL ve 87.58 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.5, Şekil 4.4).

Tablo 4.5. Paromomisine karşı farklı [µg/mL] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

Zaman	Paromomisin konsantrasyonu (µg/mL)							
	4096	2048	1024	512	256	128	64	32
Canlılık (%) - 24. saat	0	0	0	9.8	36.9	57.7	100	100
Canlılık (%) - 48. saat	0	0	0	0	8	24.2	82.7	100
Canlılık (%) - 72. saat	0	0	0	0	7.9	24	73.6	100



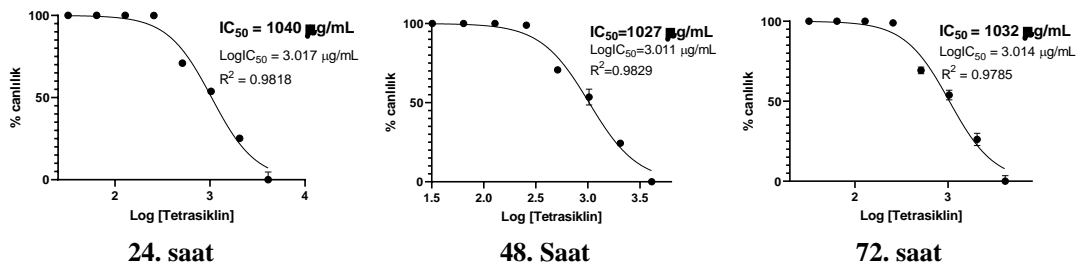
Şekil 4.4. Paromomisin'in *L. tropica* suşuna karşı IC₅₀ değerleri

4.2. *Leishmania tropica*'nın Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Antibiyotiklerin *L. tropica* suşuna karşı MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Tetrasiklinin çalışma solüsyonu, mikropalakadaki son dilüsyon aralığı 4096-32 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 4096 µg/mL konsantrasyonda promastigot canlılığı görülmezken 256 µg/mL konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Tetrasiklinin antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 1040 µg/ml, 1027 µg/ml ve 1032 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.6, Şekil 4.5).

Tablo 4.6. Tetrasikline karşı farklı [µg/mL] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

Zaman	Tetrasiklin konsantrasyonu (µg/mL)							
	4096	2048	1024	512	256	128	64	32
Canlılık (%) - 24. saat	14.4	34	59	74.1	100	100	100	100
Canlılık (%) - 48. saat	9	31.7	54.5	72.7	100	100	100	100
Canlılık (%) - 72. saat	4.4	28.5	59	70	98	100	100	100

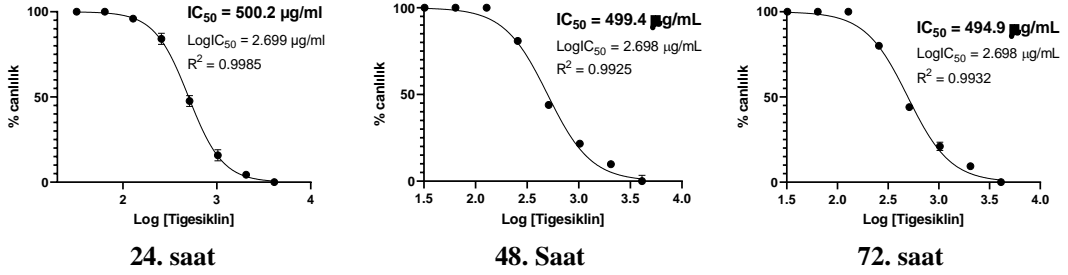


Şekil 4.5. Tetrasiklinin *L. tropica* suşuna karşı IC₅₀ değerleri

Tigesiklinin çalışma solüsyonu, mikropalakadaki son dilüsyon aralığı 4096-32 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 4096 µg/mL konsantrasyona kadar promastigot canlılığı görülmezken 128 µg/mL konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Tigesiklinin antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 500.2 µg/ml, 499.4 µg/ml ve 494.9 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.7, Şekil 4.6).

Tablo 4.7. Tigesikline karşı farklı [$\mu\text{g/mL}$] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

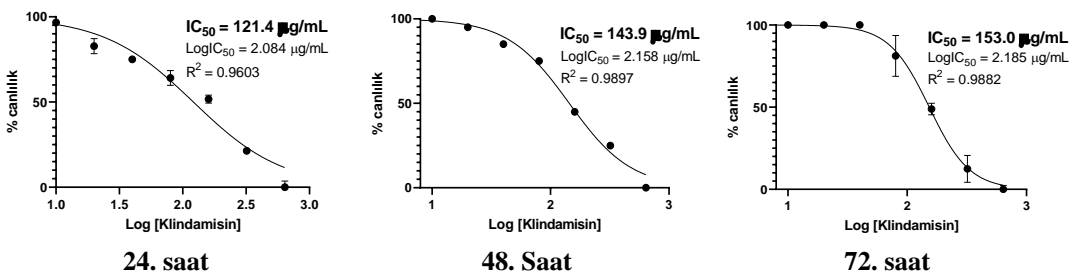
Zaman	Tigesiklin konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)							
	4096	2048	1024	512	256	128	64	32
Canlılık (%) - 24. saat	9.8	16	28	48.4	83	100	100	100
Canlılık (%) - 48. saat	8	14.6	28.2	47	80.9	95.5	100	100
Canlılık (%) - 72. saat	0	17.3	27.1	48	81.7	100	100	100

**Şekil 4.6.** Tigesiklinin *L. tropica* suşuna karşı IC₅₀ değerleri

Klindamisin'in çalışma solüsyonu, mikrolakadaki son dilüsyon aralığı 640-5 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 640 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda promastigot canlılığı görülmezken 40 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Klindamisin'in antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 121.4 $\mu\text{g/mL}$, 143.9 $\mu\text{g/mL}$ ve 153.0 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı (Tablo 4.8, Şekil 4.7).

Tablo 4.8. Klindamisine karşı farklı [$\mu\text{g/mL}$] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

Zaman	Klindamisin konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)							
	640	320	160	80	40	20	10	5
Canlılık (%) - 24. saat	5	24.7	54.5	68	76.5	80.2	95.8	100
Canlılık (%) - 48. saat	9	31.7	49.9	77.3	86.4	95.5	100	100
Canlılık (%) - 72. saat	4.8	20.8	52.9	90.3	100	100	100	100

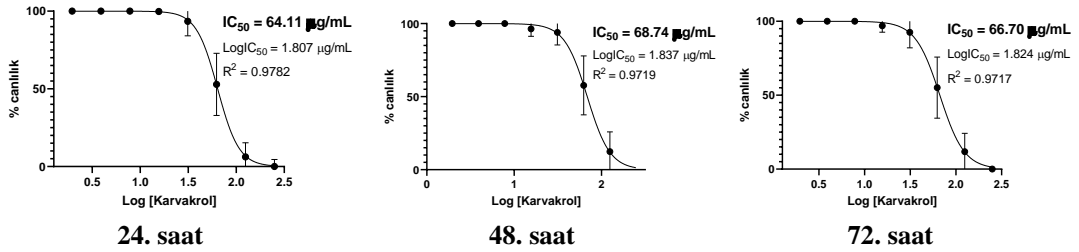
**Şekil 4.7.** Klindamisin *L. tropica* suşuna karşı IC₅₀ değerleri

4.3. *Leishmania tropica*'nın Uçucu Yağ Bileşenleri Duyarlılık Sonuçları

Karvakrolün çalışma solüsyonu, mikroplakadaki son dilüsyon aralığı 256-2 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 256 µg/mL konsantrasyonda promastigot canlılığı %11.7 iken, 16 µg/mL konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Karvakrolün antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 64.11 µg/ml, 68.74 µg/ml ve 66.7 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.9, Şekil 4.6).

Tablo 4.9. Karvakrole karşı farklı [µg/mL] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

Zaman	Karvakrol konsantrasyonu (µg/mL)							
	256	128	64	32	16	8	4	2
Canlılık (%) - 24. saat	21.9	19.1	51.3	90	100	100	100	100
Canlılık (%) - 48. saat	13	15	50.5	89.4	100	100	100	100
Canlılık (%) - 72. saat	11.7	14	47.2	86.8	100	100	100	100

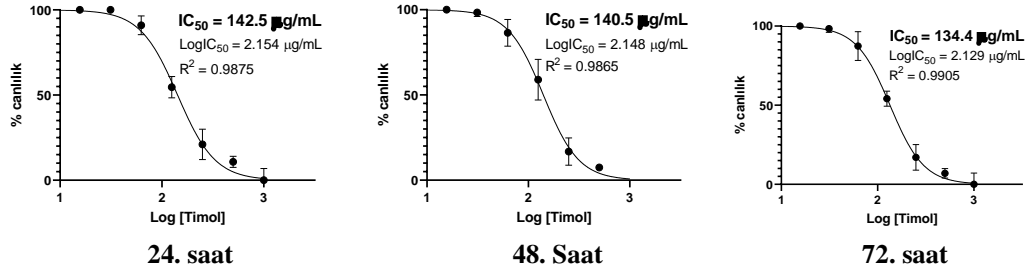


Şekil 4.8. Karvakrolün *L. tropica* suşuna karşı IC₅₀ değerleri

Timolün çalışma solüsyonu, mikroplakadaki son dilüsyon aralığı 1024-28 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskop ile kuyucuklardaki promastigot canlılığı kontrol edildiğinde, 1024 µg/mL konsantrasyonda promastigot canlılığı görülmezken 32 µg/mL konsantrasyonda promastigotların %100'ünün canlı olduğu saptandı. Timolün antilayşmanyal etkinliğini ifade eden IC₅₀ değeri ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 142.5 µg/ml, 140.5 µg/ml ve 134.4 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.10, Şekil 4.9).

Tablo 4.10. Timole karşı farklı [$\mu\text{g/mL}$] da *L. tropica* suşunun değişen duyarlılığı

Zaman	Timol konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)							
	1024	512	256	128	64	32	16	28
Canlılık (%) - 24. saat	9.6	13.5	26.5	53.1	81.9	96.9	100	100
Canlılık (%) - 48. saat	5.8	14	28.1	50.7	87.2	100	100	100
Canlılık (%) - 72. saat	0	9.4	15.6	59.5	94.1	100	100	100

**Şekil 4.9.** Timolün *L. tropica* suşuna karşı IC_{50} değerleri

Test edilen etken maddelerin *L. tropica* suşuna karşı inkübasyonun 24, 48 ve 72. saatlerindeki IC_{50} ve MPK değerleri, etken maddelerin etkinliklerinin kıyaslanmasını sağlamak için toplu olarak Tablo 4.11 verilmiştir.

Tablo 4.11. Etken maddelerin *L. tropica* suşuna karşı IC_{50} ve MPK değerleri

Etken Maddeler	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			MPK ($\mu\text{g/mL}$)		
	24. Saat	48. Saat	72. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glukantim *	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Pentostam	57.67	57.08	52	97	97	97
AmpB	0.072	0.067	0.068	0.156	0.156	0.156
Miltefosin	7.615	7.777	6.91	32	32	32
Paromomisin	167.8	91.54	87.58	512	512	512
Tetrasiklin	1040	1027	1032	2048	2048	2048
Tigesiklin	500.2	499.4	494.9	4096	4096	4096
Klindamisin	121.4	143.9	153	320	320	320
Karvakrol	64.11	68.74	66.7	256	256	256
Timol	142.5	140.5	134.4	1024	1024	1024

*mg/mL; MPK: Minimum Parazitisit Konsantrasyon, IC_{50} : Etken maddenin hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibitör konsantrasyonu,

4.4. Antilayşmanyaller ile Etken Maddelerin Sinerjik Etkileşimleri

Dama tahtası yöntemi ile yapılan kombinasyon çalışmalarında, inkübasyonun ardından dama tahtası mikroplakasında üreme olmayan en düşük

konsantrasyonlardaki her kuyucuğun hem antilayşmanyal hem antibiyotik için hesaplanan fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) değerleri toplanarak fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ) hesaplandı. En küçük FİKİ değeri baz alınarak denenen antilayşmanyal ve antibiyotiğin kombinasyon sonuçları değerlendirildi.

Glukantim ve pentostam ile yapılan kombinasyon çalışmalarının hiçbirinde sinerjik etkileşim saptanmadı. Ayrıntılı sonuçlar Tablo 4.12 ve Tablo 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4.12. Glukantim ile antibiyotik/UYB’lerinin *L. tropica* suşuna karşı etkileşimi

Kombinasyon	FİK _{PEN} /FİK _{EtkenMadde}	FİKİ	Etkileşim
GLC-TET	1/1	2	Etkisiz
GLC-TGS	1/1	2	Etkisiz
GLC-KLİ	1/1	2	Etkisiz
GLC-TİM	1/1	2	Etkisiz
GLC-KAR	1/1	2	Etkisiz

GLC: Glukantim; TET: Tetrasiklin; TGS: Tigesiklin; KLİ: Klindamisin; TİM: Timol; KAR: Karvakrol

Tablo 4.13. Pentostam ile antibiyotik/UYB’lerinin *L. tropica* suşuna karşı etkileşimi

Kombinasyon	FİK _{PEN} /FİK _{EtkenMadde}	FİKİ	Etkileşim
PEN-TET	1/125	1.125	Etkisiz
PEN-TGS	1/0.125	1.125	Etkisiz
PEN-KLİ	1/0.125	1.125	Etkisiz
PEN-TİM	1/1	2	Etkisiz
PEN-KAR	1/1	2	Etkisiz

PEN: Pentostam; TET: Tetrasiklin; TGS: Tigesiklin; KLİ: Klindamisin; TİM: Timol; KAR: Karvakrol

Miltefosinin *L. tropica* suşuna karşı tigesiklin ve klindamisin ile kombinasyonunda sinerji saptanırken, tetrasiklin ile kombinasyonunda kısmi sinerji görüldü. Miltefosinin, timol ve karvakrol ile kombinasyonlarının ise etkisiz olduğu saptandı. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.14’de verilmiştir.

Tablo 4.14. Miltefosin ile antibiyotik/UYB’lerinin *L. tropica* suşuna karşı etkileşimi

Kombinasyon	FİK _{PEN} /FİK _{EtkenMadde}	FİKİ	Etkileşim
MİLT-TET	0.5/0.007	0.507	Kısmi Sinerjik
MİLT-TGS	0.250/0.0156	0.265	Sinerji
MİLT-KLİ	0.241/0.0156	0.256	Sinerji
MİLT-TİM	1/0.015	1.015	Etkisiz
MİLT-KAR	1/0.015	1.015	Etkisiz

MİLT: Miltefosin; TET: Tetrasiklin; TGS: Tigesiklin; KLİ: Klindamisin; TİM: Timol; KAR: Karvakrol

AmpB'nin *L. tropica* suşuna karşı klindamisin ile kombinasyonunda sinerji saptanırken, timol ve karvakrol ile kombinasyonlarında kısmi sinerji görüldü. AmpB'nin, tetrasiklin ve tigesiklin ile kombinasyonlarında ise etkisiz olduğu saptandı. Sinerjik etkileşim sonuçları Tablo 4.15'de verilmiştir.

Tablo 4.15. AmfoterisinB ile antibiyotik/UYB'lerinin *L. tropica* suşuna karşı etkileşimi

Kombinasyon	FİK _{PEN} / FİK _{EtkenMadde}	FİK _i	Etkileşim
AmpB-TET	1/0.007	1.007	Etkisiz
AmpB-TGS	1/0.007	1.007	Etkisiz
AmpB-KLİ	0.015/0.0125	0.140	Sinerji
AmpB-TİM	0.5/0.125	0.625	Kısmi Sinerji
AmpB-KAR	0.5/0.125	0.625	Kısmi Sinerji

AmpB: Amfoterisin B; TET: Tetrasiklin; TGS: Tigesiklin; KLİ: Klindamisin; TİM: Timol; KAR: Karvakrol

Paromomisin'in *L. tropica* suşuna karşı klindamisin ile kombinasyonunda kısmi sinerji saptanırken, diğer kombinasyonlarında etkisiz olduğu görüldü. Kombinasyon sonuçları Tablo 4.16'de verilmiştir.

Tablo 4.16. Paromomisin ile antibiyotik/UYB'lerinin *L. tropica* suşuna karşı etkileşimi

Kombinasyon	FİK _{PEN} / FİK _{EtkenMadde}	FİK _i	Etkileşim
PAR-TET	1/1	2	Etkisiz
PAR-TGS	1/1	2	Etkisiz
PAR-KLİ	0.49/0.125	0.615	Kısmi sinerjik
PAR-TİM	1/0.25	1.25	Etkisiz
PAR-KAR	1/0.25	1.25	Etkisiz

PAR: Paromomisin; TET: Tetrasiklin; TGS: Tigesiklin; KLİ: Klindamisin; TİM: Timol; KAR: Karvakrol

5. TARTIŞMA

Leishmania'nın neden olduğu, kutanöz layşmanyaz (KL), yaklaşık 100 ülkede endemik olup her yıl ortalama 2 milyon yeni olgu görülmektedir. KL, DSÖ tarafından kontrol edilemeyen ve ihmal edilmiş tropikal bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (de Vries ve ark., 2022; DSÖ 2020). Başlıca etkeni *L. tropica* olan kutanöz layşmanyaz, Türkiye'de öncelikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde endemik olmakla birlikte, son yıllarda ülkenin orta ve batı bölgelerinde *L. major* ve *L. donovani*'nin etken olduğu yerli olguların sayısında belirgin bir artış bildirilmektedir (Özbilgin ve ark., 2020). Ülkemizde 2013-2014 arasında 4.000 civarında yerli KL olgusu bildirilmiştir. Suriye'deki iç savaş sonrası ülkemize gelen sığınmacılar nedeniyle KL olgularında artış olmuştur (Özbilgin ve ark., 2015). Savaş öncesi verilere göre, Suriye'de her yıl, tedaviye dirençli vakaların da olduğu, yaklaşık 250.000 KL hastasının bulunduğu göz önüne alındığında, ülkemizdeki KL epidemiyolojisinde önemli değişimlerin olabileceği tahmin edilmektedir. Hastalık genellikle kendi kendini sınırlayan bir seyir izlemekle birlikte, bazı durumlarda geri dönüşü olmayan skar oluşumu ve nodüler lenfanjit gelişmesi sonucu kalıcı sakatlık ve ciddi kozmetik sorunlara yol açan mukokutanöz layşmanyaz (MKL) gelişebilmektedir (de Vries ve Schallig, 2022).

Kutanöz layşmanyaz tedavisinde beş değerli antimon bileşikleri, (sodyum stiboglukonat—pentostam veya meglumin antimonat—glukantim) çoğu ülkede 50 yıldan fazla süredir ilk tedavi seçeneği olmaya devam etmektedir. Alternatif seçenek olarak, miltefosin, pentamidin isetionat, amfoterisin B (AmpB) ve diğer antifungal ajanlar (örn. ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, paromomisin) kullanılmaktadır. pentostam ve glukantim'e karşı son yıllarda tüm dünyada direnç bildirilmeye başlanmıştır (Croft ve ark., 2006; Aronson ve Joya, 2019; Santi ve ark., 2022). Deoksikolat ve lipozomal (ambisome) olmak üzere iki farklı formülasyonu KL tedavisinde kullanılan ve bir antifungal olan AmpB, kolesterol yerine ergosterol öncüllerine bağlanarak hücre ölümüyle sonuçlanan parazit membran geçirgenliğinin

artmasına yol açmaktadır. Böylece hücre zarının bütünlüğünü bozarak, hücre içeriğinin dışarı sızmasına neden olan transmembran kanalların oluşumuna yol açmaktadır (Brajtburg ve ark, 1990; Man, 2022).

Özbilgin ve ark., (2020) tarafından, glukantim tedavisine dirençli hastalardan elde edilen 5 *L. tropica* suşu ile yapılan bir çalışmada, miltefosin, glukantim, paromomisin, pentostam ve AmpB'nin antilayşmanyal aktiviteleri, 500-25 µg/mL konsantrasyon aralığında hemositometre ve XTT yöntemiyle çalışılmıştır. Bu çalışmada her bir antilayşmanyal ilacın denenen en yüksek konsantrasyonunda (500 µg/mL) promastigotların öldüğü saptanmıştır. AmpB'nin en düşük konsantrasyonda dahi (25 µg/mL) promastigotlara karşı etkili olduğu görülürken, bu ilacı etkinlik bakımından sırasına göre miltefosin, sodyum stiboglukonat, paromomisin ve meglumin antimonat takip etmiştir. İran'da Hadighi ve ark. (2007), endemik bölgelerde tedaviye yanıt vermeyen KL'li hastalardan elde edilen *L. tropica* suşlarına karşı üç antilayşmanyal ilacın aktivitesini araştırmış, suşların pentostam'a dirençli, miltefosine ve paromomisine ise duyarlı olduğunu ve bu iki ilacın layşmanyaz tedavisinde yararlı olabileceğini ifade etmiştir. Diğer bir çalışmada ise Jamal ve ark. (2015), *L. tropica* (KWH23) promastigotlarına karşı glukantim, miltefosin, pentostam ve AmpB için anti-leishmanial etkinliği ifade eden IC₅₀ değerini sırasıyla, 16.34 µg/mL, 11.68 µM, 21.84 µg/mL ve 0,075 µM olarak bildirmiştir.

Çalışmamızda, *L. tropica* suşuna karşı glukantim etkisiz bulunurken miltefosin, pentostam ve AmpB'nin IC₅₀ değerleri sırasıyla 7.77 µg/mL, 57.08 µg/mL ve 0.067 µg/mL olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız ile yukarıda tartışılan çalışmalar karşılaştırıldığında, suş farklılığına rağmen glukantim dışında diğer antilayşmanyallerin etkinliği uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda meglumin antimonatın saf ve analitik etken maddesi temin edilemediği için hasta preparatı olan glukantim denenmiş ve bu ilaç *L. tropica* suşuna karşı beklenenin aksine etkisiz bulunmuştur. Glukantim için elde edilen bu sonucun, yöntemsel çeşitli faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Glukantim ve pentostam, kutanöz ve mukokutanöz layşmanyaz tedavisinde yaygın olarak kullanılan yüksek maliyetli ilaçlar olup kardiyak toksisite ve hepatik enzim düzeylerinde yükselme gibi ciddi yan etkilere neden olmakla birlikte ikinci seçenek ilaçlar olan AmpB ve miltefosin için de benzer bir durum söz konusudur (Berbert ve ark., 2018). Miltefosin, *L. tropica* veya *L. major*'un neden olduğu KL'li çocuklarda, iyi sonuç veren ve oral olarak uygulanan sistemik bir tedavi seçeneğidir. Özellikle ağırlı lokal tedavi seçenekleri için güvenli ve etkili bir alternatiftir (Ollech ve ark 2020). İsrail'de miltefosin ile tedavi edilen KL'li 10 çocuğun (≤ 18 yaş) 8'inin *L. tropica*, 2'sinin ise *L. major* ile enfekte olduğu, 2 (%20) hastanın tedavisinin başarısızlıkla sonuçlandığı bildirilmiş, çocuklarda kutanöz layşmanyazın tedavisinde oral miltefosinin etkili ve güvenli bir tedavi seçeneği olabileceği ifade edilmiştir. Miltefosinin *in vitro* ve *in vivo* antileishmanial aktivitesi ilk olarak Croft ve ark. (1987) tarafından araştırılmış olup *Leishmania* türlerinin miltefosine aynı oranda duyarlı olmadığı rapor edilmiştir.

Antilayşmanyal ilaç aktivitesinin taranmasında kullanılan *in vitro* yöntemlerde sonuçların yorumlanması ve karşılaştırılmasının kolay olmayacağı ve antilayşmanyal etkinlik için en uygun *in vitro* test yönteminin hücre içi amastigot modeli olduğu ileri sürülmüştür (Vermeersch ve ark. 2009). Bunlara ek olarak, kullanılan makrofaj hücrelerindeki farklılıklar, etken maddelerin makrofajlar üzerindeki etkileri, promastigotların infektivite oranındaki değişiklikler, klinik izolatlar ile referans suşların duyarlılığındaki farklılıklar, sonuçların yorumlanmasını karmaşık hale getirmektedir (da Luz ve ark., 2009; Seifert ve ark., 2010; Yardley ve ark., 2005). Bu nedenle, *Leishmania* suşlarının etken maddelere karşı duyarlılık testlerinde standardizasyona ihtiyaç vardır. Miltefosinin etki mekanizmasına yönelik son yıllarda çeşitli hipotezler öne sürülmüş ancak hiçbiri kesin olarak gösterilememiş, önerilen mekanizmaların çokluğu ve bazı çalışmalardan elde edilen çelişkili veriler, miltefosinin birden fazla etki mekanizmasına sahip olabileceğini düşündürmüştür (Dorlo ve ark., 2012).

Layşmanyazın ikinci basamak tedavisinde 1960'lardan beri kullanılan bir antifungal olan AmpB, mantarların yanı sıra *Leishmania* ve *Trypanosoma cruzi*'ye

karşı seçici aktiviteye sahiptir. Bu seçicilik, AmpB'nin, ergosterole, memeli konak hücrelerinde bulunan kolesterolden daha yüksek afinite göstermesinden kaynaklanmaktadır. Farklı türlerin hücre zarlarında bulunan sterollerin tipi ve miktarındaki farklılıklar, AmpB'nin tür düzeyindeki duyarlılığını etkileyebilmektedir (Beach ve ark., 1988). Bir olgu sunumunda hem intralezyonal hem de sistemik glukantim tedavisi sonucu, lokal yan etki gelişen KL'li bir hastanın sistemik lipozomal AmpB ile başarılı bir şekilde tedavi edildiği bildirilmiştir (Yeşilova ve ark. 2015).

Antilayşmanyal ilaç kullanımı sonrasında ilaç direncinin gelişmesi ve yan etkilerin ortaya çıkması nedeniyle, araştırmacılar hastalıkların tedavisi için yeni doğal kaynaklar ve aday moleküller bulmaya odaklanmıştır (AlMohammed ve ark., 2021). Kullanımda olan antilayşmanyal ilaçların yüksek maliyetli olması, endemik bölgelerde ilaca erişimi sınırlandırmakta ve doğal kaynaklara yönelimi artırmakta, bu da dozu ayarlanmamış, hekim kontrolünde olmayan bir süreci başlatabilmektedir. Bu nedenle doğal kaynaklardan üretilebilecek aday moleküller, bu çalışmada yapıldığı gibi, enfeksiyon etkenlerine karşı tek başına etkinliği veya diğer biyoaktif maddelerle sinerjik etkileşimleri ve farklı biyoaktif özellikleri bakımından incelenerek test edilmelidir.

Bu çalışmada, yapılan ön denemelerde uçucu yağların içeriğinde bulunan ana bileşenlerden karvakrol, timol, ökaliptol, öganol, sinnemaldehit, linalool, limonen, para-simen, alfa-pimen'nin *L. tropica*'nın promastigotlarına karşı antilayşmanyal etkileri araştırılmış, en güçlü antilayşmanyal aktivite karvakrol ve timol'de görüldüğü için (veriler sunulmamıştır) kombinasyon çalışmalarında bu iki uçucu yağ bileşeni çalışılmıştır.

Ana bileşenleri karvakrol ve timol olan kekik uçucu yağının antibakteriyel ve antiparaziter özelliklere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Hikal ve ark. 2021; Farias-Junior ve ark, 2012; Xavier ve ark, 2016; Machado ve ark, 2010, Ben Arfa ve ark, 2006; Vardar-Ünlü ve ark., 2003). Youssefi ve ark. (2019) karvakrol ve timolün, *L. infantum* promastigotlarına karşı *in vitro* etkinliğini mikrodilüsyon yöntemi ile araştırmış ve IC₅₀ değerini sırasıyla 7.2 ve 9.8 µg/mL olarak bildirmiştir. Monzote ve ark. (2006) içeriğinde %62 oranında karvakrol bulunan *Chenopodium*

ambrosioides uçucu yağının, *L. amazonensis*'un promastigot ve amastigot formlarına karşı IC₅₀ değerlerini sırasıyla, 15.3 ve 13.6 µg/mL olarak saptamıştır (Monzote ve ark. 2013). Essid ve ark. (2015) tarafından, *Lamiaceae* familyasına ait çeşitli aromatik bitkilerin uçucu yağları üzerinde yapılan bir çalışmada, 12 adet uçucu yağ ve 8 ana bileşenin *L. major* ve *L. infantum* promastigotlarına karşı *in vitro* etkinliği mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmış, IC₅₀ değerlerinin uçucu yağlar için 16.3-0.05 µg/mL arasında değiştiği, karvakrol ve ökaliptolün ise sırasıyla 7.3 ve 53.4 µg/mL olduğu rapor edilmiştir. İki farklı *Lippia sidoides* uçucu yağının *L. chagasi* promastigotlarına karşı denendiği bir çalışmada, Farias-Junior ve ark. (2012), 72 saatlik inkübasyondan sonra IC₅₀ değerlerini sırasıyla 74.1 ve 54.8 µg/mL, uçucu yağın ana bileşenleri olan timol ve karvakrolün IC₅₀ değerlerini ise sırasıyla, 9.8 ve 2.3 µg/mL olarak saptamıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada, Taşdemir ve ark. (2019) içeriğinde %70.6 karvakrol ve %1.8 timol bulunan *Origanum onites* uçucu yağının *in vitro* antilayşmanyal aktivitesini *L. donovani* suşuna karşı çalışmış ve total uçucu yağ, karvakrol ve timolün IC₅₀ değerlerini sırasıyla, 17.8 µg/mL, 13.1 µg/mL ve 17.3 µg/mL olarak bildirmiştir. Benzer bir çalışmada *L. infantum* promastigotlarına karşı, içeriğinde sırasıyla %74.6 ve %68.2 oranında karvakrol bulunan, *Thymbra capitata* ve *Origanum virens* uçucu yağlarının IC₅₀ değerleri, 130 ve 196 µg/mL olarak saptanmıştır (Machado ve ark., 2010). Silva ve ark. (2017) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, *L. amazonensis* promastigotlarına karşı *p*-simen, karvakrol ve timolün *in vitro* antilayşmanyal etkinliği araştırılmış, *p*-simenin etkisiz (IC₅₀ >1000 µg/mL), diğer bileşenlerin ise sırasıyla, 25.4 ve 26.8 µg/mL IC₅₀ değerleri ile etkili olduğu saptanmıştır. Güler ve ark. (2020) tarafından, Kıbrıs'a endemik olan ve içeriğinde %81.8 karvakrol bulunan *Origanum dubium* uçucu yağının *L. tropica* promastigotlarına karşı antilayşmanyal aktivitesini ifade eden LD₅₀ değeri 0.2 µg/mL olarak saptanmıştır. De Medeiros ve ark. (2011), timol oranı %78.3 olan *Lippia sidoides* uçucu yağının ve saf timolün *L. amazonensis*'in promastigotlarına karşı IC₅₀ değerlerini sırasıyla 44.3 ve 22.6 µg/ml olarak bildirmiştir. Benzer bir çalışmada De Morais ve ark. (2014), *L. infantum* promastigotlarına karşı timol ile asetil-timol ve benzoil-timol gibi timol türevlerinin IC₅₀ değerlerini sırasıyla, 12.8 µg/mL, 8.6 µg/mL ve 9 µg/mL olarak rapor etmiştir.

Uçucu yağlar ile içeriğinde bulunan bileşenlerin saf formlarının farklı antimikrobiyal etkinlik sergilemesi, total yağın, içinde bulunan diğer minör bileşenlerin varlığı ile total bir etki göstermesi ve farklı hedef bölgeleri etkilemesi veya minör bileşenlerin olası adjuvan etkileri gibi nedenlerden kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamızda, *L. tropica* promastigotlarına karşı karvakrol ve timolün IC₅₀ değerleri sırasıyla, 68.74 ve 140.5 µg/mL olarak bulunmuştur. Verilerimiz diğer çalışmalar ile uyumlu olmakla birlikte, çalışmalarda kullanılan suşlar ve analiz yöntemlerindeki farklılıklar değişken sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir.

Layşmanyaz enfeksiyonlarında oluşan lezyonlarda sıklıkla bakteri ve mantar kaynaklı sekonder enfeksiyon gelişebilmekte ve bu durum tedavi sürecini olumsuz etkilemektedir. Sekonder enfeksiyon varlığında antilayşmanyal tedaviye ek olarak çeşitli antibiyotikler ve antifungal ilaçlar da kullanılmaktadır (Al-Salem ve ark., 2019; Yehia ve ark., 2017; Akulinina ve ark. 2021). Ayrıca bazı antibiyotik ve antifungal ilaçların antilayşmanyal aktiviteleri de *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (Masmoudi ve ark., 2008, Malik ve ark., 2019).

Tetrasiklinler geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olup hastalıkların tedavisinde hem sistemik hem de topikal olarak uygulanabilmektedir (Akulinina ve ark. 2021). Katiyar ve Edlind, (1991) lipofilik ve lipofilik olmayan tetrasiklin türevlerini *L. major* promastigotlarına karşı araştırmış ve IC₅₀ değerlerini sırasıyla, 21 ve 52 µg/mL olarak saptamıştır. Lipofilik olan tiatetrasiklinin nispeten daha yüksek antilayşmanyal etkinliğe sahip olmasında, lipofilik tetrasiklinlerin oral uygulamayı takiben dokulara daha iyi penetre olmasının ve hücreye pasif difüzyonla taşınmasının etkili olabileceği ifade edilmiştir (Katiyar ve Edlind, 1991). Akulinina ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, tetrasiklin grubu bir antibiyotik olan doksisisiklin ile glukantimin antilayşmanyal etkinliği *L. majör* suşuna karşı hamster modelinde karşılaştırılmış, otuz günlük tedavi sonunda enfekte hamsterların her iki ilaçla da başarılı bir şekilde iyileştiği, buna ek olarak doksisisiklinin glukantime göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Masmoudi ve ark., 2005; Masmoudi ve ark., 2008). Ancak antibiyotiklerin antilayşmanyal etkinliğine ve tedavi başarısına yönelik bu veriler çok sınırlı olup klinik öncesi çalışmalar hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Yapılan bazı çalışmalarda doksisisiklinin, hücre içi penetrasyonunun iyi olması nedeniyle, *Leishmania* üzerinde doğrudan etki gösterdiği, proteaz-antiproteaz dengesini etkilediği, kollajenaz aktivitesini inhibe ettiği ve anti-inflamatuar aktiviteyi tetiklediği ifade edilmiştir (Bonnetblanc, 2002; Humbert ve ark., 1991a, 1991b). Çalışmamızda *L. tropicaya* karşı tetrasiklinin IC₅₀ değeri 1027 µg/mL olarak belirlenmiştir. Tetrasiklinin antilayşmanyal etkinliği ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma olup söz konusu çalışmalarda kullanılan suş, etken madde ve yöntem farklılıklarından dolayı değişken sonuçlar elde edilmektedir.

Tigesiklin, tetrasiklin sınıfına ait bir glisilsiklin olup (Olson ve ark, 2006), Gram-pozitif, Gram-negatif, atipik, anaerobik ve diğer tedavisi zor patojenlere karşı oldukça etkili yeni nesil bir antibiyotiktir. Tigesiklin, tetrasiklin direncinden sorumlu iki önemli mekanizma olan dışatım pompa ve/veya ribozomal kaynaklı direnci yenmek için özel olarak tasarlanmıştır (Bauer ve ark., 2004; Starzengruber ve ark., 2009). Tigesiklinin antilayşmanyal etkinliğine yönelik literatürde sadece bir çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, *Plasmodium falciparum* ve *Acanthamoeba castellanii* gibi diğer parazitlere karşı bu antibiyotiğin denendiği sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmüştür (Held ve Issifou, 2010; Jha ve ark., 2015; Nettey ve ark. 2016). Nettey ve ark. (2016) tarafından *L. donovani* promastigotlarına karşı yapılan bir çalışmada, içerisinde antibiyotiklerin de bulunduğu 56 farklı ilacın antilayşmanyal etkinliği 160-2.5 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmış, tetrasiklin ve tigesiklinin düşük dozlarda *L. donovani*ye karşı aktivite göstermediği bildirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tetrasiklin ve tigesiklin, yukarıdaki çalışmayla uyumlu olarak *L. tropica* promastigotlarına karşı sırasıyla, 1027 ve 500.2 µg/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda etkili bulunmuştur.

Linkozamidlerin bir üyesi olan klindamisin, Gram pozitif bakterilere, mikoplazmalara ve anaerop mikroorganizmalara karşı etkili bir antibiyotiktir (Aydın, 2007). Doudi ve ark. (2012), KL pozitif olan hastaların %68'nde lezyonların en sık *Staphylococcus aureus* (%41.7) ve *S. epidermidis* (%28) ile koenfekte olduğunu ve kutanöz layşmanyaz lezyonlarında gelişebilen sekonder bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde klindamisinin etkin şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir. Çalışmamızda

L. tropicaya karşı klindamisin için IC₅₀ değeri 143.9 µg/mL olarak saptanmış olup klindamisinin düşük konsantrasyonda güçlü antilayşmanyal etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Sekonder bakteri enfeksiyonu gelişen KL lezyonlarında klindamisinin kullanımı hem bakterilerin hem de *Leishmania*'nın inhibisyonu açısından tedaviyi olumlu etkileyebilir. Bu nedenle daha kapsamlı *in vivo* çalışmalarda, birincil antilayşmanyal ilaçlar ile klindamisin kombinasyonunun araştırılması uygun olabilir.

Layşmanyazın tedavisinde hem sistemik hem de topikal tedaviler uygulanmaktadır. Uygun ilacın seçiminde; uygulama kolaylığı, maliyet etkinliği, temin edilebilirliği ve yan etki profilleri gibi faktörler dikkate alınmaktadır. Ayrıca ilaçların toksik etkilerinin minimuma indirilmesi açısından kombinasyon tedavilerinin önemi birçok çalışmada gösterilmiştir (Berbert ve ark., 2018).

Çalışmamızda, *L. tropica*'ya karşı antilayşmanyal ilaçların hem antibiyotikler hem de uçucu yağ bileşenleri ile etkileşimlerinin dama tahtası yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Etkili antilayşmanyal ilaçlardan biri olan miltefosinin, antibiyotiklerden tigesiklin ve klindamisin ile sinerjik, tetrasiklin ile kısmi sinerjik etkileşim gösterdiği, uçucu yağ bileşenleri olan timol ve karvakrol ile etkileşim göstermediği gözlemlendi. Hem antifungal hem de antilayşmanyal olan AmpB'nin, klindamisin ile kombinasyonunda sinerjik etkileşim gözlenirken, timol ve karvakrol ile kısmi sinerjik etkileşim gösterdiği, tetrasiklin ve tigesiklin ile etkileşim göstermediği saptandı. Literatürde *L. tropica*'ya karşı aynı kombinasyonların araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Antilayşmanyal ilaçlar ile sık kullanılan antibiyotikler ve doğal biyoaktif bileşenler arasında sinerjik bir etkileşim olması, kombinasyon tedavisinde kullanılan maddelerin daha düşük dozlarda etkili olmasına, potansiyel toksik yan etkilerinin daha aza indirilmesine, tedavi maliyetlerinin düşürülmesine ve ilaca direnç gelişiminin önlenmesine katkı sağlayabilir. Bununla birlikte, fitokimyasalların, antibiyotiklerin ve diğer biyoaktif maddelerin mevcut antilayşmanyaller ile kombine terapötik uygulama potansiyelini gösterebilmek için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Çalışmada denenen antilayşmanyal ilaçlar içinde en güçlü etkinlik 0,067 µg/mL IC₅₀ değeri ile AmpB'de saptanırken bunu 7,77 µg/mL, 57,08 µg/mL ve 91,54 µg/mL IC₅₀ değerleri ile sırasıyla, miltefosin, pentostam ve paromomisin izlemiştir.
- 2- Çalışmada denenen antibiyotikler içinde en güçlü antilayşmanyal etkinlik 143,9 µg/mL IC₅₀ değeri ile klindamisinde saptanırken bunu 500,2 ve 1027 µg/mL IC₅₀ değeri sırasıyla, tigesiklin ve tetrasiklin izlemiştir.
- 3- Çalışmada denenen karvakrol ve timolün, 68.74 ve 140.5 µg/mL IC₅₀ değeri ile güçlü antilayşmanyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.
- 4- Glukantim ve pentostamın diğer etken maddelerle kombinasyonları etkisiz bulunmuştur.
- 5- AmpB ile antibiyotik kombinasyonlarında, AmpB-klindamisin kombinasyonunda sinerji saptanırken, tetrasiklin/tigesiklin kombinasyonları etkisiz bulunmuştur.
- 6- AmpB ile karvakrol ve timol kombinasyonlarında, her iki kombinasyon içinde kısmi sinerji saptanmıştır.
- 7- Miltefosin ile antibiyotik kombinasyonlarında, tüm antibiyotiklerle sinerjik etkileşimler görülmüştür.
- 8- Miltefosin ile karvakrol ve timol kombinasyonları etkisiz bulunmuştur.
- 9- Paromomisin ile antibiyotik kombinasyonlarında, paromomisin-klindamisin kombinasyonunda kısmi sinerjik etkileşim saptanırken, tetrasiklin/tigesiklin kombinasyonları etkisiz bulunmuştur.
- 10- Paromomisin ile karvakrol ve timol kombinasyonları etkisiz bulunmuştur.
- 11- Farklı etken maddeler eklenerek çalışmanın içeriği ve literatüre katkısı artırılabilir.
- 12- Klinik örneklerden soyutlanmış, çok sayıda ve farklı türdeki *Leishmania* suşuna karşı antilayşmanyallerin farklı antibiyotikler ve uçucu yağ bileşenleri ile sinerji çalışmaları yapılabilir.

- 13- Antilayşmanyallerin antibiyotikler ile etkileşimi deney hayvanı modelleri ile çalışabilir.
- 14- Antibiyotik-antibiyotik etkileşimlerinin *L. tropica* suşuna karşı etkileşimi hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda araştırılabilir.
- 15- Antilayşmanyal ilaçların farklı etken maddelerle sinerjik etkileşim göstermesi, yeni kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi açısından umut vericidir.

KAYNAKLAR

- Abdellah Farah; Mohamed Fechtal; Abdelaziz Chaouch; Saadia Zrira (2002). The essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* and its natural hybrid (clone 583) from Morocco. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(5), 395–397. doi:10.1002/ffj.1114
- Adams, E. R., Schoone, G. J., Ageed, A. F., Safi, S. E., & Schallig, H. D. (2010). Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 591–596. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0369>
- Akulina, I. K., Berechikidze, I. A., Larina, S. N., Sakharova, T. V., Degtyarevskaya, T. Y., & Romanelli, M. (2021). Effectiveness of doxycycline for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis *in vivo*. *Parasitology*, 148(3), 361–365. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002152>
- AlMohammed, H. I., Khudair Khalaf, A., E Albalawi, A., Alanazi, A. D., Baharvand, P., Moghaddam, A., & Mahmoudvand, H. (2021). Chitosan-Based Nanomaterials as Valuable Sources of Anti-Leishmanial Agents: A Systematic Review. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(3), 689. <https://doi.org/10.3390/nano11030689>
- Alptekin, D., Kasap, M., Luleyap, U., Kasap, H., Aksoy, S., & Wilson, M. L. (1999). Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa, Turkey. *Journal of Medical Entomology*, 36(3), 277–281.
- Al-Salem, W. S., Solórzano, C., Weedall, G. D., Dyer, N. A., Kelly-Hope, L., Casas-Sánchez, A., Alraey, Y., Alyamani, E. J., Halliday, A., Balghonaim, S. M., Alsohibany, K. S., Alzeyadi, Z., Alzahrani, M. H., Al-Shahrani, A. M., Assiri, A. M., Memish, Z., & Acosta-Serrano, Á. (2019). Old World cutaneous leishmaniasis treatment response varies depending on parasite species, geographical location and development of secondary infection. *Parasites & Vectors*, 12(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3453-4>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Amiri H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012, 728065. <https://doi.org/10.1155/2012/728065>
- Antoine, J.-C., Prina, E., Lang, T., & Courret, N. (1998). *The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages*. *Trends in Microbiology*, 6(10), 392–401. doi:10.1016/s0966-842 x (98)01324-9
- Aronson, N. E., & Joya, C. A. (2019). Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>
- Aronson, N. E., Wortmann, G. W., Byrne, W. R., Howard, R. S., Bernstein, W. B., Marovich, M. A., Polhemus, M. E., Yoon, I. K., Hummer, K. A., Gasser, R. A., Jr, Oster, C. N., & Benson, P. M. (2010). A randomized controlled trial of local heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3), e628. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000628>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E., Ephros, M., Jeronimo, S., & Magill, A. (2017). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society

of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>

Arunasree K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 17(8-9), 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.12.008>

Aydın, K. (2007) Makrolidler ve Linkozamidler. *ANKEM Derg* 2007;21(Ek 2):57-61

Aytekin, S. (2009). Kutanöz Laysmanyaziste Tedavi Yaklaşımları/Treatment Approaches for Cutaneous Leishmaniasis. *Türkderm: Türk Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi= Turkderm: Turkish Archives of Dermatology and Venereology*, 43(2), 44.

Bari A. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*. 2006; 16:247-8

Barral, A., Badaró, R., Barral-Netto, M., Grimaldi, G., Jr, Momem, H., & Carvalho, E. M. (1986). Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(4), 732–734. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.732>

Bates P. A. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 340–344. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.003>

Bauer, G., Berens, C., Projan, S. J., & Hillen, W. (2004). Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(4), 592–599. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh125>

Beach, D. H., Goad, L. J., & Holz, G. G., Jr (1988). Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania promastigotes*. *Molecular and biochemical parasitology*, 31(2), 149–162. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90166-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90166-1)

Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>

Berbert, T. R. N., de Mello, T. F. P., Wolf Nassif, P., Mota, C. A., Silveira, A. V., Duarte, G. C., Demarchi, I. G., Aristides, S. M. A., Lonardoní, M. V. C., Vieira Teixeira, J. J., & Silveira, T. G. V. (2018). Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review. *Dermatology Research and Practice*, 2018, 9014726. <https://doi.org/10.1155/2018/9014726>

Berman, J. D., & Neva, F. A. (1981). Effect of temperature on multiplication of *Leishmania amastigotes* within human monocyte-derived macrophages in vitro. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(2), 318–321. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.318>

Berman, J. D., Badaro, R., Thakur, C. P., Wasunna, K. M., Behbehani, K., Davidson, R., Kuzoe, F., Pang, L., Weerasuriya, K., & Bryceson, A. D. (1998). Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(1), 25–32.

Bern, C., Maguire, J. H., & Alvar, J. (2008). Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(10), e313. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000313>

Bhandari, V., Sundar, S., Dujardin, J. C., & Salotra, P. (2014). Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2580–2585. <https://doi.org/10.1128/AAC.01574-13>

Boggild, A. K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Martinez-Medina, D., Llanos-Cuentas, A., & Low, D. E. (2008). Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 847–852.

Bonnetblanc J. M. (2002). Doxycycline [Doxycycline]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 129(6-7), 874–882.

Bracamonte, M. E., Álvarez, A. M., Sosa, A. M., Hoyos, C. L., Lauthier, J. J., Cajal, S. P., Juarez, M., Uncos, R. E., Sánchez-Valdéz, F. J., Acuña, L., Diosque, P., Basombrió, M. A., Nasser, J. R., Hashiguchi, Y., Korenaga, M., Barroso, P. A., & Marco, J. D. (2020). High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* amastigotes membrane crude antigens. *PloS One*, 15(5), e0232829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232829>

Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., & Medoff, G. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2), 183–188. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.2.183>

Brook, I., Lewis, M. A., Sándor, G. K., Jeffcoat, M., Samaranayake, L. P., & Vera Rojas, J. (2005). Clindamycin in dentistry: more than just effective prophylaxis for endocarditis?. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 100(5), 550–558. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.02.086>

Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

Camargos, H. S., Moreira, R. A., Mendanha, S. A., Fernandes, K. S., Dorta, M. L., & Alonso, A. (2014). Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. *PloS One*, 9(8), e104429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104429>

Camps, M., Arrizabalaga, G., & Boothroyd, J. (2002). An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*, 43(5), 1309–1318. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02825.x>

Carvalho, R. C. V., Sousa, V. C., Santos, L. P., Santos, I. L. D., Diniz, R. C., Rodrigues, R. R. L., Medeiros, M. D. G. F., Rodrigues, K. A. D. F., Alves, M. M. M., Arcanjo, D. D. R., & Carvalho, F. A. A. (2021). Limonene-carvacrol: A combination of monoterpenes with enhanced antileishmanial activity. *Toxicology in vitro*, 74, 105158. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105158>

Chaves, Thiago P.; Pinheiro, Raizza Eveline E.; Melo, Eveny S.; Soares, Maria José dos S.; Souza, João Sammy N.; Andrade, Tiago Brito de; Lemos, Telma Leda Gomes de; Coutinho, Henrique D.M. (2018). *Essential oil of Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Industrial Crops and Products*, 112(), 70–74. doi:10.1016/j.indcrop.2017.10.048

Cojean, S., Houzé, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., Michard, F., Bories, C., Pratlong, F., Le Bras, J., Loiseau, P. M., & Matheron, S. (2012). *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), 704–706. <https://doi.org/10.3201/eid1804.110841>

Colares, A. V., Almeida-Souza, F., Taniwaki, N. N., Souza, C.daS., da Costa, J. G., Calabrese, K.daS., & Abreu-Silva, A. L. (2013). In Vitro Antileishmanial Activity of Essential Oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 727042. <https://doi.org/10.1155/2013/727042>

Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W., & Chan, J. H. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 36(16), 2633–2636. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90543-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90543-0)

- Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 111–126. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
- Cunha, M. A., Leão, A. C., de Cassia Soler, R., & Lindoso, J. A. (2015). Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(6), 1214–1218. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0033>
- da Luz, R. I., Vermeersch, M., Dujardin, J. C., Cos, P., & Maes, L. (2009). In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5197–5203. <https://doi.org/10.1128/AAC.00866-09>
- Daldal, N., Ozbel, Y., Babaoglu, A., Turgay, N., Alkan, M. Z., Bablioglu, N., & Ozcel, M. A. (1998). *Phlebotomus major syriacus*: a possible vector of visceral Leishmaniasis in western Black Sea region of Turkey. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 28(1), 271–275.
- Davidson, R. N., den Boer, M., & Ritmeijer, K. (2009). Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7), 653–660. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.09.008>
- de Almeida, M. C., Vilhena, V., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2003). Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 861–870. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700001>
- De Brito, R. C. F., Aguiar-Soares, R. D. O., Cardoso, J. M. O., Coura-Vital, W., Roatt, B. M., & Reis, A. B. (2020). Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(19), 8105–8116. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10846-y>
- de Medeiros, M. d. da Silva, A. C., Citó, A. M., Borges, A. R., de Lima, S. G., Lopes, J. A., & Figueiredo, R. C. (2011). In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitology International*, 60(3), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.004>
- De Morais, S. M., Vila-Nova, N. S., Bevilaqua, C. M. L., Rondon, F. C., Lobo, C. H., de Alencar Araripe Noronha Moura, A., ... de Andrade, H. F. (2014). *Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(21), 6250–6255. doi:10.1016/j.bmc.2014.08.020
- de Morais, S. R., Oliveira, T. L., Bara, M. T., da Conceição, E. C., Rezende, M. H., Ferri, P. H., & de Paula, J. R. (2012). Chemical Constituents of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 363919. <https://doi.org/10.1155/2012/363919>
- de Vries, H., & Schallig, H. D. (2022). Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *American Journal of Clinical Dermatology*, 23(6), 823–840. <https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8>
- Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., & Nakhasi, H. L. (2003). Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *International journal for parasitology*, 33(3), 257–267.
- Descoteaux, A., & Turco, S. J. (2002). Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes and Infection*, 4(9), 975–981. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01624-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01624-6)
- Doğan, F. 1981. Sayfa 25-50. *Leishmania* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi *Leishmania*'ların Rezervuar ve Vektörleri, Layşmanyaz Kala-azar ve Şark çıbanı. 2. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası.
- Donovan, C. (1994). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903.

- Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576–2597
- Doudi, M., Setorki, M., & Narimani, M. (2012). Bacterial superinfection in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 18(9), BR356–BR361. <https://doi.org/10.12659/msm.883345>
- Duggar B. M. (1948). Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51(Art. 2), 177–181. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1948.tb27262.x>
- Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., & Montoya, J. G. (2018). *Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). doi:10.1128/cmr.00057-17
- Eichenberger, A., Buechi, A. E., Neumayr, A., Hatz, C., Rauch, A., Huguenot, M., Diamantis-Karamitopoulou, E., & Staehelin, C. (2017). A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2192-4>
- Eliopoulos G, Moellering R.C. Antimicrobial Combinations. In: Lorian V, Ed, Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1996, 330-396.
- Erber, A. C., Sandler, P. J., de Avelar, D. M., Swoboda, I., Cota, G., & Walochnik, J. (2022). Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 15(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05133-2>
- Essid, R., Rahali, F. Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., ... Limam, F. (2015). Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 77, 795–802. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.049
- Et-Touys, A., Bouyahya, A., Fellah, H., Mniouil, M., El Boury, H., Dakka, N., ... & Bakri, Y. (2017). Antileishmanial activity of medicinal plants from Africa: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(12), 826-840 doi: 10.12980/apjtd.7.2017D7-215
- Faber, W. R., Oskam, L., van Gool, T., Kroon, N. C., Knecht-Junk, K. J., Hofwegen, H., van der Wal, A. C., & Kager, P. A. (2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(1), 70–74. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.492>
- Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D., Cunha, J. M., Grespan, R., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. (2012). Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-based complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2012, 657026. <https://doi.org/10.1155/2012/657026>
- Farias-Junior, P. A., Rios, M. C., Moura, T. A., Almeida, R. P., Alves, P. B., Blank, A. F., ... Scher, R. (2012). Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Biological Research*, 45(4), 399–402. doi:10.4067/s0716-97602012000400012)
- Fichera, M. E., & Roos, D. S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*, 390(6658), 407–409. <https://doi.org/10.1038/37132>
- Finlay, A. C., Hobby, G. L., P'an, S. Y., Regna, P. P., Routien, J. B., Seeley, D. B., ... & Kane, J. H. (1950). Terramycin, a new antibiotic. *Science*, 111(2874), 85-85. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Apr 1;6(4):a025387. doi: 10.1101/cshperspect.a025387. PMID: 26989065; PMCID: PMC4817740.

García-Hernández, R., Manzano, J. I., Castanys, S., & Gamarro, F. (2012). *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1974. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001974>

Goad, L. J., Holz, G. G., Jr, & Beach, D. H. (1984). Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Molecular and biochemical parasitology*, 10(2), 161–170. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(84\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(84)90004-5)

Goto, H., & Lindoso, J. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(4), 419–433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

Goto, H., & Lindoso, J. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(4), 419–433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

Grossman T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a025387. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>

Guimarães, A. G., Oliveira, G. F., Melo, M. S., Cavalcanti, S. C., Antonioli, A. R., Bonjardim, L. R., Silva, F. A., Santos, J. P., Rocha, R. F., Moreira, J. C., Araújo, A. A., Gelain, D. P., & Quintans-Júnior, L. J. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 107(6), 949–957. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00609.x>

Güler, E., Özbilgin, A., Çavuş, İ., Baddal, B., Etikan, İ., Başer, K. H. C., & Şanlıdağ, T. (2021). *In vitro* Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Growing in Northern Cyprus Against *Leishmania tropica*. Kuzey Kıbrıs'ta Yetişen Bitkilerden Elde Edilen Uçucu Yağlarda *Leishmania tropica*'ya Karşı *in vitro* Anti-leishmanial Etkinlik Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 45(2), 101–107. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.6888>

Hadighi R, Mohebalı M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M (2006) Unresponsiveness to Glucantime Treatment in Iranian Cutaneous Leishmaniasis due to Drug-Resistant *Leishmania tropica* Parasites. *PLoS Med* 3(5): e162. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030162>

Hadighi, R., Boucher, P., Khamesipour, A., Meamar, A. R., Roy, G., Ouellette, M., & Mohebalı, M. (2007). Glucantime-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. *Parasitology Research*, 101(5), 1319–1322. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0638-0>

Hajaji, S., Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Reyes-Battle, M., Jiménez, I. A., Bazzocchi, I. L., Valladares, B., Akkari, H., Lorenzo-Morales, J., & Piñero, J. E. (2018). Leishmanicidal activity of α -bisabolol from Tunisian chamomile essential oil. *Parasitology Research*, 117(9), 2855–2867. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5975-7>

Haldar, A. K., Sen, P., & Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular Biology International*, 2011, 571242. <https://doi.org/10.4061/2011/571242>

Harman, M. (2015). Kutanöz Leishmaniasis. *Turkish Journal of Dermatology/Türk Dermatoloji Dergisi*, 9(4).

Hassan, A. A., Khalid, H. E., Abdalla, A. H., Mukhtar, M. M., Osman, W. J., & Efferth, T. (2022). Antileishmanial Activities of Medicinal Herbs and Phytochemicals In Vitro and In Vivo: An Update for the Years 2015 to 2021. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21), 7579. <https://doi.org/10.3390/molecules27217579>

Held, J., Zanger, P., Issifou, S., Kremsner, P. G., & Mordmüller, B. (2010). In vitro activity of tigeicycline in *Plasmodium falciparum* culture-adapted strains and clinical isolates from

Gabon. *International journal of antimicrobial agents*, 35(6), 587–589.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.02.003>

Hendrickx, S., Beyers, J., Mondelaers, A., Eberhardt, E., Lachaud, L., Delputte, P., Cos, P., & Maes, L. (2016). Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in *Leishmania infantum*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(7), 1914–1921. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw096>

Hepburn N. C. (2000). Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 25(5), 363–370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2000.00664.x>

Herwaldt B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 354(9185), 1191–1199. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2)

Hikal, W. , Tkachenko, K. , Said-Al Ahl, H. , Sany, H. , Sabra, A. , Baeshen, R. and Bratovic, A. (2021) Chemical Composition and Biological Significance of Thymol as Antiparasitic. *Open Journal of Ecology*, 11, 240-266. doi: [10.4236/oje.2021.113018](https://doi.org/10.4236/oje.2021.113018).

Hosseinzadeh, M., Omidifar, N., & Lohrasb, M. H. (2012). Use of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping method. *Tropical Doctor*, 42(2), 112–113. <https://doi.org/10.1258/td.2011.110420>

Humbert, P., Treffel, P., Chapuis, J. F., Buchet, S., Derancourt, C., & Agache, P. (1991). The tetracyclines in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(4), 691–697. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70255-z](https://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70255-z)

Ilaghi, M., Sharifi, I., Sharififar, F., Sharifi, F., Oliae, R. T., Babaei, Z., Meimamandi, M. S., Keyhani, A., & Bamorovat, M. (2021). The potential role and apoptotic profile of three medicinal plant extracts on *Leishmania tropica* by MTT assay, macrophage model and flow cytometry analysis. *Parasite Epidemiology and Control*, 12, e00201. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00201>

Jamal, Q., Khan, N. H., Wahid, S., Awan, M. M., Sutherland, C., & Shah, A. (2015). In-vitro sensitivity of Pakistani *Leishmania tropica* field isolate against buparvaquone in comparison to standard anti-leishmanial drugs. *Experimental Parasitology*, 154, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.017>

Jara, M., Adauí, V., Valencia, B. M., Martínez, D., Alba, M., Castrillon, C., Cruz, M., Cruz, I., Van der Auwera, G., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J. C., & Arevalo, J. (2013). Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1826–1833. <https://doi.org/10.1128/JCM.00208-13>

Jeronimo, S. M. B., de Queiroz Sousa, A., Pearson, R. D. (2011). Sayfa 969. “Leishmaniasis”. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*, Editörler: Guerrant, RL., Walker, DH., Weller, PF. Philadelphia: SAGnders Elsevier.

Jha, B. K., Seo, I., Kong, H. H., Suh, S. I., Suh, M. H., & Baek, W. K. (2015). Tigecycline inhibits proliferation of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology research*, 114(3), 1189–1195. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4302-1>

Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P., & Madhubala, R. (2009). Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology*, 164(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.007>

Kar K. (1995). Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(2), 123–152. <https://doi.org/10.3109/10408419509113537>

Katiyar, S. K., & Edlind, T. D. (1991). Enhanced antiparasitic activity of lipophilic tetracyclines: role of uptake. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(11), 2198–2202. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.11.2198>

- Kedzierski, L., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Andrews, P. C., Junk, P. C., & Kedzierska, K. (2009). Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Current Medicinal Chemistry*, 16(5), 599-614.
- Khan, I., Khan, M., Umar, M. N., & Oh, D. H. (2016). Attenuation and Production of the Amphotericin B-Resistant *Leishmania tropica* Strain. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(6), e32159. <https://doi.org/10.5812/jjm.32159>
- Khatun, M., Alam, S. M. S., Khan, A. H., Hossain, M. A., Haq, J. A., Alam Jilani, M. S., Rahman, M. T., & Karim, M. M. (2017). Novel PCR primers to diagnose visceral leishmaniasis using peripheral blood, spleen or bone marrow aspirates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 753-759. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.002>
- Killick-Kendrick R. (1978). Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. *Acta tropica*, 35(4), 297-313.
- Kim, D. H., Chung, H. J., Bleys, J., & Ghohestani, R. F. (2009). Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(2), e381. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000381>
- Kleinberg M. (2006). What is the current and future status of conventional amphotericin B?. *International journal of antimicrobial agents*, 27 Suppl 1, 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.013>
- Komaki, A., Hoseini, F., Shahidi, S., & Baharlouei, N. (2015). Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(3), 257-261. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.01.001>
- Köhler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., & Roos, D. S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5305), 1485-1489. <https://doi.org/10.1126/science.275.5305.1485>
- Layegh, P., Pezeshkpoor, F., Soruri, A. H., Naviafar, P., & Moghiman, T. (2009). Efficacy of cryotherapy versus intralesional meglumine antimoniate (glucantime) for treatment of cutaneous leishmaniasis in children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 172-175.
- Leishman, W. B. (1903). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal*, 1(2213), 1252.
- Li, Y.j, Pan, C.z, Zhao, Z.w, Zhao, Z.x, Chen, H.l, & Lu, W.b (2013). Effects of a combination of amlodipine and imipenem on 42 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from a teaching hospital in Guangzhou, China. *BMC Infectious Diseases*, 13, 548. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-548>
- López, L., Robayo, M., Vargas, M., & Vélez, I. D. (2012). Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trials*, 13, 58. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-13-58>
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., & Opperdoes, F. R. (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*, 111(1), 1-14.
- Machado, M., Dinis, A. M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., & Sousa, M. C. (2014). Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. *Veterinary Parasitology*, 200(1-2), 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.016>
- Machado, M., Santoro, G., Sousa, M. C., Salgueiro, L., & Cavaleiro, C. (2010). Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(3), 156-160.

- Machado, M., Dinis, A. M., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Custódio, J. B., & Sousa, M.doC. (2010). Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitology research*, *106*(5), 1205–1215. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1800-7>
- Mahmoud A. L. (1994). Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in applied microbiology*, *19*(2), 110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00918.x>
- Malik, F., Hanif, M. M., & Mustafa, G. (2019). Comparing the Efficacy of Oral Chloroquine versus Oral Tetracycline in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, *29*(5), 403–405. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2019.05.403>
- Man, E., Price, H. P., & Hoskins, C. (2022). Current and future strategies against cutaneous parasites. *Pharmaceutical research*, *39*(4), 631–651. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03232-y>
- Mans, D. R., Kent, A. D., Hu, R. V., Lai A Fat, E. J., Schoone, G. J., Adams, E. R., Rood, E. J., Alba, S., Sabajo, L. O., Lai A Fat, R. F., de Vries, H. J., & Schallig, H. D. (2016). Monitoring the response of patients with cutaneous leishmaniasis to treatment with pentamidine isethionate by quantitative real-time PCR, and identification of *Leishmania* parasites not responding to therapy. *Clinical and Experimental Dermatology*, *41*(6), 610–615. <https://doi.org/10.1111/ced.12786>
- Markell, E. K., Voge, M., & John, D. T. (1999). Other blood and tissue dwelling protozoa. *Markell and Voge's Medical Parasitology*, 123-188.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, *27*(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Marquardt, W. C., Demare, R. S., Grieve, R. B. 2000. Sayfa 57. “Leishmania and the Leishmanioses”. *Parasitology and Vector Biology*. San Diego, California: Academic Pres.
- Masmoudi, A., Dammak, A., Chaaben, H., Maalej, N., Akrouf, F., & Turki, H. (2008). Doxycycline for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Dermatology Online Journal*, *14*(8), 22.
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, *107*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
- Memişoğlu, H. R., & Özpoyraz, M. (1997). Kutanöz leishmaniasis. *Ankem Derg*, *11*(3), 319-29.
- Mesa, L. E., Manrique, R., Muskus, C., & Robledo, S. M. (2020). Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in patients with clinical or epidemiological suspicion of CL: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *14*(1), e0007981. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007981>
- Mitropoulos, P., Konidas, P., & Durkin-Konidas, M. (2010). New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *63*(2), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.06.088>
- Mondelaers, A., Sanchez-Cañete, M. P., Hendrickx, S., Eberhardt, E., Garcia-Hernandez, R., Lachaud, L., Cotton, J., Sanders, M., Cuypers, B., Imamura, H., Dujardin, J. C., Delputte, P., Cos, P., Caljon, G., Gamarro, F., Castanys, S., & Maes, L. (2016). Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. *PloS One*, *11*(4), e0154101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154101>
- Monge-Maillo, B., & López-Vélez, R. (2015). Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clinical Infectious Diseases*, *60*(9), 1398–1404. <https://doi.org/10.1093/cid/civ004>

- Monroy-Ostria, A., Nasereddin, A., Monteon, V. M., Guzmán-Bracho, C., & Jaffe, C. L. (2014). ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 607287. <https://doi.org/10.1155/2014/607287>
- Moreira, O. C., Yadon, Z. E., & Cupolillo, E. (2018). The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Tropica*, 184, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020>
- Morizot, G., Jouffroy, R., Faye, A., Chabert, P., Belhouari, K., Calin, R., Charlier, C., Miallhes, P., Siriez, J. Y., Mouri, O., Yera, H., Gilquin, J., Tubiana, R., Lanternier, F., Mamzer, M. F., Legendre, C., Peyramond, D., Caumes, E., Lortholary, O., & Buffet, P. (2016). Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), e0004304. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004304>
- Murugan, N., & Natarajan, D. (2018). Bionanomedicine for antimicrobial therapy-a case study from *Glycosmis pentaphylla* plant mediated silver nanoparticles for control of multidrug resistant bacteria. *Letters in Applied NanoBioScience*, 8, 523-540.
- National Center for Biotechnology Information (2020) PubChem Compound Summary for CID 446598, Clindamycin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clindamycin>
- Neal, R. A., Allen, S., McCoy, N., Oliaro, P., & Croft, S. L. (1995). The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(5), 577–584. <https://doi.org/10.1093/jac/35.5.577>
- Nettey, H. , Allotey-Babington, G. , Nguessan, B. , Afrane, B. , Tagoe, M. , Ababio, A. , Botchway, P. , Darko, Y. , Sasu, C. and Nyarko, A. (2016) Screening of Anti-Infectives against *Leishmania donovani*. *Advances in Microbiology*, 6, 13-22. doi: 10.4236/aim.2016.61002.
- Odiwuor, S. O., Saad, A. A., De Doncker, S., Maes, I., Laurent, T., El Safi, S., Mbuchi, M., Büscher, P., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2011). Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(2), 209–218. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1071-3>
- Ollech, A., Solomon, M., Horev, A., Reiss-Huss, S., Ben-Amitai, D., Zvulunov, A., Friedland, R., Atar-Snir, V., Molho-Pessach, V., Barzilai, A., & Greenberger, S. (2020). Cutaneous Leishmaniasis Treated with Miltefosine: A Case Series of 10 Paediatric Patients. *Acta Dermato-Venereologica*, 100(18), adv00322. <https://doi.org/10.2340/00015555-3669>
- Olson, M. W., Ruzin, A., Feyfant, E., Rush, T. S., 3rd, O'Connell, J., & Bradford, P. A. (2006). Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), 2156–2166. <https://doi.org/10.1128/AAC.01499-05>
- Omondi, Z. N., Arserim, S. K., Töz, S., & Özbel, Y. (2022). Host–Parasite Interactions: Regulation of *Leishmania* Infection in Sand Fly. *Acta Parasitologica*, 67(2), 606-618.
- Osorio, E., Arango, G., Robledo, S., Munoz, D., Jaramillo, L., & Velez, I. (2007). Antileishmanial and cytotoxic activity of synthetic aromatic monoterpens. *ACTA FARMACEUTICA BONAERENSE*, 25(3), 405.
- Ouellette, M. ve Papadopoulou, B. (1993). *Leishmania*'da ilaç direnci mekanizmaları. *Parazitoloji Bugün*, 9(5), 150–153. doi:10.1016/0169-4758(93)90135-310.1016/0169-4758
- Özbel, Y., Özensoy Töz, S. (2007). Sayfa 197-241. “Layşmanyaz”. *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. Editör: Özcel, MA., Özbel, Y., Ak, M. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını.
- Özbel, Y., Özensoy, S. 2009. Sayfa 407-24. “*Leishmania*'nın Moleküler Biyolojisi”. *Moleküler Parazitoloji*. Editör: Özcel, MA. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri.

Özbilgin A, Yıldırım A, Çavuş İ, Baştemir S (2015). Manisa İli 3 Yerli Kutanöz Leishmaniasis Olgusu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(2), 103-108.

Özbilgin, A., Çavuş, İ., Kaya, T., Yıldırım, A., & Harman, M. (2020). Comparison of *in vitro* Resistance of Wild *Leishmania* Isolates, Which are Resistant to Pentavalent Antimonial Compounds, Against Drugs Used in the Treatment of Leishmaniasis. *Turkiye Parazitolojii Dergisi*, 44(1), 12–16. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6661>

Özbilgin, A., Çavuş, İ., Yıldırım, A., Kaya, T., & Ertabaklar, H. (2018). Evaluation of In vitro and In vivo Drug Efficacy Over *Leishmania tropica*: A Pilot Study. *Turkiye Parazitolojii Dergisi*, 42(1), 11–19. <https://doi.org/10.5152/tpd.2018.5554>

Özcel, M. A., Daldal, N. (1997). *Artropod Hastalıkları ve Vektörler*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği yayını.

Pace D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of Infection*, 69 Suppl 1, S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., & Bréard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 852-859.

Pastor, J., García, M., Steinbauer, S., Setzer, W. N., Scull, R., Gille, L., & Monzote, L. (2015). Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*. *Acta Tropica*, 145, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.002>

PÉREZ-RAMOS, J. (2012). Antiprotozoa activity of some essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(15), 2901-2908.

Pérez-Victoria, J. M., Bavchvarov, B. I., Torrecillas, I. R., Martínez-García, M., López-Martín, C., Campillo, M., Castanys, S., & Gamarro, F. (2011). Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3838–3844. <https://doi.org/10.1128/AAC.00065-11>

Pigott, D. M., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K. A., Battle, K. E., Brady, O. J., Messina, J. P., Balard, Y., Bastien, P., Pralongs, F., Brownstein, J. S., Freifeld, C. C., Mekaru, S. R., Gething, P. W., George, D. B., Myers, M. F., Reithinger, R., & Hay, S. I. (2014). Global distribution maps of the leishmaniasis. *eLife*, 3, e02851. <https://doi.org/10.7554/eLife.02851>

Pillai, S. K., Moellering, R. C. Jr. ve Eliopoulos, G. M. (2005). *Antimicrobial combinations*. V. Lorian (Ed.), *Antibiotics in laboratory medicine içinde* (5th ed., ss. 365-439). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Poinar G., Jr (2008). *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasites & Vectors*, 1(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-22>

Poinar, G., Jr, & Poinar, R. (2004). *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*, 155(3), 305–310. <https://doi.org/10.1078/1434461041844259>

Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopolou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

Ready P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6, 147–154. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>

Rezaei Azizi Sevil, N. (2008). Bodrum Yarımadasında leishmaniasis epidemiyolojisinin araştırılması.

- Rijal, S., Ostyn, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N. R., Dorlo, T. P., Beijnen, J. H., Vanaerschot, M., Decuyper, S., Dhakal, S. S., Das, M. L., Karki, P., Singh, R., Boelaert, M., & Dujardin, J. C. (2013). Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clinical Infectious Diseases*, *56*(11), 1530–1538. <https://doi.org/10.1093/cid/cit102>
- Robledo, S., Osorio, E., Munoz, D., Jaramillo, L. M., Restrepo, A., Arango, G., & Vélez, I. (2005). In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(4), 1652-1655.
- Rocio, C., Amato, V. S., Camargo, R. A., Tuon, F. F., & Nicodemo, A. C. (2014). Liposomal formulation of amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis in HIV-negative patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *108*(3), 176–178. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru011>
- Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, *124*(Pt 5), 495–507. <https://doi.org/10.1017/s0031182002001439>
- Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Mikhailov, A., Maia-Elkhoury, A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., ... & Gasimov, E. (2021). Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une période de référence pour la feuille de route à l'horizon 2030. *Weekly Epidemiological Record*, *96*(35), 401-420.
- Sacks, D. L., & Perkins, P. V. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science (New York, N.Y.)*, *223*(4643), 1417–1419. <https://doi.org/10.1126/science.6701528>
- Sacks D. L. (1992). The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infectious agents and disease*, *1*(4), 200–206.
- Sacks, D. L., Kenney, R. T., Kreutzer, R. D., Jaffe, C. L., Gupta, A. K., Sharma, M. C., Sinha, S. P., Neva, F. A., & Saran, R. (1995). Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet (London, England)*, *345*(8955), 959–961. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90703-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90703-3)
- Sacks, D., & Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*, *3*(11), 1041–1047. <https://doi.org/10.1038/ni1102-1041>
- Sánchez, C., Aznar, R., & Sánchez, G. (2015). The effect of carvacrol on enteric viruses. *International journal of food microbiology*, *192*, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.028>
- Sánchez-Borges, M., Thong, B., Blanca, M., Ensina, L. F., González-Díaz, S., Greenberger, P. A., Jares, E., Jee, Y. K., Kase-Tanno, L., Khan, D., Park, J. W., Pichler, W., Romano, A., & Jaén, M. J. (2013). Hypersensitivity reactions to non beta-lactam antimicrobial agents, a statement of the WAO special committee on drug allergy. *The World Allergy Organization Journal*, *6*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-18>
- Santana, R. C., Rosa, A. D. S., Mateus, M. H. D. S., Soares, D. C., Atella, G., Guimarães, A. C., Siani, A. C., Ramos, M. F. S., Saraiva, E. M., & Pinto-da-Silva, L. H. (2020). In vitro leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of Protium (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, *259*, 112981. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112981>
- Santi, A. M. M., & Murta, S. M. F. (2022). Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of *Leishmania* spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 826287. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.826287>
- Santos, D. O., Coutinho, C. E., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B., Bernardino, A., Bourguignon, S. C., Corte-Real, S., Pinho, R. T., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2008). Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, *103*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0943-2>

Saroufim, M., Charafeddine, K., Issa, G., Khalifeh, H., Habib, R. H., Berry, A., Ghosn, N., Rady, A., & Khalifeh, I. (2014). Ongoing epidemic of cutaneous leishmaniasis among Syrian refugees, Lebanon. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1712–1715. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140288>

Satow, M. M., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Rocha, M. C., Oyafuso, L. K., Soler, R. C., Cotrim, P. C., & Lindoso, J. A. (2013). Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 55(6), 393–399. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000600004>

Seifert, K., Matu, S., Javier Pérez-Victoria, F., Castanys, S., Gamarro, F., & Croft, S. L. (2003). Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *International journal of antimicrobial agents*, 22(4), 380–387. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00125-0](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00125-0)

Seifert, K., Escobar, P., & Croft, S. L. (2010). In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 508–511. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp500>

Sen, R., & Chatterjee, M. (2011). Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 18(12), 1056–1069. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.004>

Sen, R., Bandyopadhyay, S., Dutta, A., Mandal, G., Ganguly, S., Saha, P., & Chatterjee, M. (2007). Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 9), 1213–1218. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47364-0>

Sen, R., Ganguly, S., Saha, P., & Chatterjee, M. (2010). Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.03.008>

Silva, A. R. S. T., Scher, R., Santos, F. V., Ferreira, S. R., Cavalcanti, S. C. H., Correa, C. B., Bueno, L. L., Alves, R. J., Souza, D. P., Fujiwara, R. T., & Dolabella, S. S. (2017). Leishmanicidal Activity and Structure-Activity Relationships of Essential Oil Constituents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5), 815. <https://doi.org/10.3390/molecules22050815>

Singh, S., & Sivakumar, R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *Journal of postgraduate medicine*, 49(1), 55.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). *Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1202–1205. doi:10.1021/jf950540t

Solomon, M., Baum, S., Barzilai, A., Pavlotsky, F., Trau, H., & Schwartz, E. (2009). Treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional sodium stibogluconate. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 23(10), 1189–1192. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03157.x>

Spížek, J., & Řezanka, T. (2017). Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology*, 133, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.001>

Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A. K., Singh, A., Shankar, P., & Singh, S. (2017). Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites & Vectors*, 10(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1969-z>

Starzengruber, P., Thriemer, K., Haque, R., Khan, W. A., Fuehrer, H. P., Siedl, A., Hofecker, V., Ley, B., Wernsdorfer, W. H., & Noedl, H. (2009). Antimalarial activity of tigeocycline, a novel glycylicycline antibiotic. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 4040–4042. <https://doi.org/10.1128/AAC.00312-09>

- Stein, G. E., & Babinchak, T. (2013). Tigecycline: an update. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 75(4), 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.12.004>
- Steverding D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Sum, P. E., & Petersen, P. (1999). Synthesis and structure-activity relationship of novel glycylicycline derivatives leading to the discovery of GAR-936. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(10), 1459–1462. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(99\)00216-4](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(99)00216-4)
- Sundar, S., Singh, A., Rai, M., Prajapati, V. K., Singh, A. K., Ostyn, B., Boelaert, M., Dujardin, J. C., & Chakravarty, J. (2012). Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clinical Infectious*, 55(4), 543–550. <https://doi.org/10.1093/cid/cis474>
- Sundar S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 6(11), 849–854. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00778.x>
- Schwartz, E., Hatz, C., & Blum, J. (2006). New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(6), 342–349. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70492-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70492-3)
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Demirci, B., Demirci, F., & Baser, K. H. C. (2019). Antiprotozoal Activity of Turkish *Origanum onites* Essential Oil and Its Components. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), 4421. <https://doi.org/10.3390/molecules24234421>
- Toz, S. O., Culha, G., Zeyrek, F. Y., Ertabaklar, H., Alkan, M. Z., Vardarlı, A. T., Gunduz, C., & Ozbel, Y. (2013). A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of Leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2205. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
- Tiphine, M., Letscher-Bru, V., & Herbrecht, R. (1999). Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 1(4), 273–283. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.1999.010406.x>
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., de Souza, R. M., Ribeiro, V. S. T., & Amato, V. S. (2022). Liposomal drug delivery systems for the treatment of leishmaniasis. *Parasitology Research*, 121(11), 3073–3082. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07659-5>
- Unat E. K. (1988). Antibiyotiklerin Tarihiçesi. *Tip Tarihi Arastirmalari = History of Medicine Studies*, 2, 102–114.
- Uzun, S., Durdu, M., Culha, G., Allahverdiyev, A. M., & Memisoglu, H. R. (2004). Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey. *The Journal of Parasitology*, 90(4), 853–859. <https://doi.org/10.1645/GE-185R>
- Vairinhos, J. & Miguel, M. (2020). Essential oils of spontaneous species of the genus *Lavandula* from Portugal: a brief review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 75(7-8), 233-245. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0044>
- Van Griensven, J., Diro E. (2019). Visceral leishmaniasis: Recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infectious disease clinics of North America*, 33(1), 79-99. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>
- Van Griensven, J., Ritmeijer, K., Lynen, L., & Diro, E. (2014). Visceral leishmaniasis as an AIDS defining condition: towards consistency across WHO guidelines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2916.

Vardar-Unlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E., & Tepe, B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(1), 63–67. <https://doi.org/10.1021/jf025753e>

Vermeersch, M., da Luz, R. I., Toté, K., Timmermans, J. P., Cos, P., & Maes, L. (2009). In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3855–3859. <https://doi.org/10.1128/AAC.00548-09>

WHO (World Health Organization) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

World Health Organization, “Regional Office for the Eastern Mediterranean. (2014). Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region”. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/120002>.

World Health Organization. “Chagas disease (American trypanosomiasis)”. <http://www.who.int/chagas/en/>.

World Health Organization. 2010. “Technical Report Series 949. Control of the Leishmaniasis.”. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.

Yardley, V., Croft, S. L., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Koirala, S., Rijal, S., Miranda, C., Llanos-Cuentas, A., & Chappuis, F. (2005). The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2), 272–275.

Yehia, H. M., Al-Olayan, E. M., El-Khadragy, M. F., & Metwally, D. M. (2017). In Vitro and In Vivo Control of Secondary Bacterial Infection Caused by *Leishmania major*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), 777. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070777>

Yeşilova, Y., Turan, E., Sürücü, H. A., Aksoy, M., & Özbilgin, A. (2015). Sistemik Lipozomal Amfoterisin B Tedavisine Cevap Veren Kutanöz Leishmaniasis Olgusu [Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with amphotericin B; a case of unresponsive to pentavalent antimony therapy]. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39(1), 63–65. <https://doi.org/10.5152/tpd.2015.3761>

Youssefi, M. R., Moghaddas, E., Tabari, M. A., Moghadamnia, A. A., Hosseini, S. M., Farash, B. R. H., Ebrahimi, M. A., Mousavi, N. N., Fata, A., Maggi, F., Petrelli, R., Dall'Acqua, S., Benelli, G., & Sut, S. (2019). In Vitro and In Vivo Effectiveness of Carvacrol, Thymol and Linalool against *Leishmania infantum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), 2072. <https://doi.org/10.3390/molecules24112072>

Zanetti, A. D. S., Sato, C. M., Longhi, F. G., Ferreira, S. M. B., & Espinosa, O. A. (2019). Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-*Leishmania* antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 61, e42. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961042>

Zhanel, G. G., Homenuik, K., Nichol, K., Noreddin, A., Vercaigne, L., Embil, J., Gin, A., Karlowsky, J. A., & Hoban, D. J. (2004). The glycolcyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs*, 64(1), 63–88. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464010-00005>

Zhang, Y., Niu, Y., Luo, Y., Ge, M., Yang, T., Yu, L. L., & Wang, Q. (2014). Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. *Food chemistry*, 142, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.058>

Ziaie, H., & Sadeghian, G. (2008). Isolation of bacteria causing secondary bacterial infection in the lesions of Cutaneous Leishmaniasis. *Indian Journal of Dermatology*, 53(3), 129–131. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.43217>

Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A., el-Hassan, I. M., & el-Hassan, A. M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 3(2), 87–98. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00517-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00517-6)

Xavier, F. J., Rodrigues, K. A., de Oliveira, R. G., Lima Junior, C. G., Rocha, J. D., Keesen, T. S., de Oliveira, M. R., Silva, F. P., & Vasconcellos, M. L. (2016). Synthesis and In Vitro Anti Leishmania amazonensis Biological Screening of Morita-Baylis-Hillman Adducts Prepared from Eugenol, Thymol and Carvacrol. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(11), 1483. <https://doi.org/10.3390/molecules21111483>

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Burcu KÖYDEN
EĞİTİM	
Lise	: Balıkesir Cumhuriyet Anadolu Lisesi (2011-2015)
Lisans	: Bandırma Onyedi Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi (2015-2019)
Yüksek lisans	: Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (2020-2023)
Doktora	: -
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: E seviyesi (YÖKDİL: 53.75 Nisan 2023)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti	



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR



(0 266) 612 14 62
sagbilen@balikesir.edu.tr
<http://www.balikesir.edu.tr>

